

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. DE ODONTOLOGÍA

**Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre
flora mixta salival**

TESIS

Para obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Belden Ivan Mamani Curazi

ASESOR

Elba Estefanía Martínez Cadillo

Lima – Perú

2013

PRESIDENTE: CD. Esp. Lizardo Sáenz Quiroz

MIEMBRO: CD. Esp. Andrew Alejandro Estrada

MIEMBRO ASESOR: Blg. Elba Estefanía Martínez Cadillo

Dedicatoria

*A Dios, por su cuidado y por darme
la oportunidad de seguir aprendiendo
cada día más .*

*A mis padres, por ser los formadores
de mis valores morales y espirituales,
por su ayuda incondicional y apoyo
durante todos mis estudios.*

*A mi esposa, por ser mi fuente de inspiración diaria
por ser mi brazo derecho en el estudio y el trabajo.*

Agradecimientos

A mi alma mater "Universidad Nacional Mayor de San Marcos" que la llevo en el corazón, porque en sus aulas adquirí conocimientos, invaluables y experiencias inolvidables.

A la facultad de odontología y a sus docentes, quienes lograron inspirarme para ser mejor profesional.

A la Bióloga. Elba Estefanía Martínez Cadillo, por su asesoría y orientación para hacer realidad el presente trabajo.

*Al Doctor en Farmacia y Bioquímica
Américo Jorge Castro Luna por su apoyo incondicional en el presente trabajo*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I INTRODUCCIÓN	6
II MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes	8
2.2 Bases teóricas	17
2.3 Planteamiento del problema	49
2.4 Justificación	49
2.5 Objetivos de investigación	49
2.6 Hipótesis	50
III MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1 Tipo de Estudio	50
3.2 Población y Muestra	51
3.3 Operacionalización de variables	51
3.4 Materiales	52
3.5 Métodos	53
3.5.1 Procedimientos y Técnicas	53
3.5.2 Recolección de datos	56
IV RESULTADOS	57
V DISCUSIÓN	64
VI CONCLUSIONES	66
VII RECOMENDACIONES	67
RESUMEN	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	76

I INTRODUCCIÓN

La fitoterapia es la terapia basada en plantas, alimentos y elementos nutritivos. Se encuentra entre las más antiguas. Esta terapia utiliza esencias puras de plantas para tratar diversos problemas, así dermatológicos, alérgicos, digestivos, ginecológicos, etc. Disminuyendo los efectos secundarios y haciendo más efectivos los tratamientos. La fitoterapia a través de los extractos naturales y sus destilaciones artificiales constituye la base de la medicina moderna y de la cosmética actual.

Se sabe que multitud de pueblos descubrieron ya en tiempos remotos, que algunas plantas eran buenas para comer y alimentarse y otras se caracterizaban por tener propiedades curativas. Con toda certeza, la búsqueda de algún remedio fue la génesis del uso de las plantas para su propio beneficio, ya fuera fruto del deseo de sanar o por cuestión mágico-religiosa, siendo simplemente en la mayoría de los casos con motivo de la búsqueda de nuevos alimentos.

Los egipcios, desarrollaron la utilización de las plantas medicinales de forma sistemática y estructurada, conociéndose más de 700 fórmulas en las que aparecen plantas curativas, destacando el impreso más importante, el *Papiro de Ebers*, 1700 A.C., pudiendo atribuirle un origen anterior en Asia. En China se supone que ya era utilizada en el 5000 A.C., destacando el libro de Pen Tsao que recoge el estudio de más de 300 plantas.

En la India se menciona la utilización de las plantas medicinales en *Rig Veda*, uno de los libros sagrados del brahmanismo. El *Ayurveda* o como se conoce el uso de las plantas medicinales en la India, hace referencias escritas al año 800 A.C., describiendo unas 800 especies. El conocimiento de las plantas medicinales se extendió desde el Antiguo Egipto y Mesopotamia hacia los países mediterráneos, hasta Grecia y luego por toda Europa para llegar 2000 años más tarde al Nuevo Mundo.

El conocimiento de las plantas medicinales, ya sea a través de la magia, religión, necesidad o casualidad, o a veces como consecuencia del ensayo-error ha permitido obtener un conocimiento de las plantas medicinales entre las diferentes culturas que constituyen la base de la medicina moderna, sabiduría que nos corresponde a todos conocer y salvaguardar como parte de nuestro patrimonio. En la actualidad ha resurgido el interés público y científico en el desarrollo de la medicina natural tradicional con el impulso de nuevas tecnologías que descubren cada día nuevas propiedades y aplicaciones a los diferentes principios activos de las plantas, subrayando el carácter dinámico y de servicio en beneficio de la humanidad en el estudio de las plantas medicinales.

La odontología no escapa de estos antecedentes históricos, que nos ofrecen una alternativa a tomar en cuenta, y a la vez nos estimula para asumir con responsabilidad nuevos retos que nos llevan a proponer recursos novedosos para el control y tratamiento de las enfermedades estomatológicas con mayor prevalencia en nuestra población.

II MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Rasooli I, Shayegh S, y Astaneh S. (2009)

Evaluaron los efectos antimicrobianos de aceites esenciales de *Mentha spicata* y *Eucalyptus camaldulensis* y clorhexidina frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, in vitro e in vivo relacionado a la formación de biopelículas. Los aceites esenciales se analizaron mediante cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS). 15 y 21 compuestos fueron identificados en los aceites esenciales de *M. spicata* y *E. camaldulensis*, respectivamente. Las concentraciones mínimas bactericidas (MBC) de aceites esenciales de *M. spicata* y *E. camaldulensis* se encontró que 4 y 2 mg/ml, y de clorhexidina (2%) eran 8 y 1mg/ml, para ambos *S.mutans* y *S. pyogenes*, respectivamente. Tiempo de reducción decimal de *S. mutans* de *M. spicata* y aceites de *E. camaldulensis* en sus niveles de CBM fue de 2,8 minutos, mientras que la de clorhexidina fue de 12,8 min. El valor de *S. pyogenes* expuestos a los niveles de MBC de aceites de *M. spicata* y *E. camaldulensis* y de clorhexidina fueron 4,3; 3,6 y 2,8 minutos respectivamente. Concluyeron que los aceites esenciales de *E. camaldulensis* y *M. spicata* retrasan significativamente la formación de biofilm y pueden contribuir al desarrollo de tratamientos anticaries nuevos.¹

Rasooli I. y Col.

Las propiedades antimicrobianas y la prevención de formación de biofilm de aceites esenciales *Mentha piperita* y *Rosmarinus officinalis* y clorhexidina fueron evaluados frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*. 26 y 20 compuestos fueron identificados por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas de *M. piperita* y *R. officinalis*, respectivamente. Las concentraciones

bactericidas mínimas (CBM) de aceites de *M. piperita* y *R. officinalis*, y clorhexidina son (6000, 2000, 8000 ppm) y (1000, 4000, 1000 ppm) de *S. mutans* y *S. pyogenes*, respectivamente. El tiempo de reducción decimal (D) de *S. mutans* expuestos a los aceites en sus niveles MBC fue de 2,8 minutos, mientras clorhexidina mostró un tiempo más largo. Los valores D de *S. pyogenes*, sobre la exposición a los niveles de MBC de aceites esenciales *M. piperita* y *R. officinalis* y de clorhexidina fueron 2,14, 4,28 y 2,8 minutos, lo que indica una mayor eficacia de aceite esencial de *M. piperita*. La formación de biopelículas se realizó mediante el cultivo de *S. mutans* cultivo con y sin aceites esenciales en medio LB en tubos de poliestireno. In vitro las propiedades inhibitorias de biopelículas estaban en el orden de *M. piperita* > *R. officinalis* > clorhexidina.

En experimentos in vivo sobre las propiedades antibiopelícula reveló que todas las concentraciones de los aceites fueron significativamente representativas ($p < 0,001$) más eficaz que la clorhexidina. Concluyeron que, los aceites esenciales pueden ser considerados como agentes de seguros en el desarrollo de agentes antibiopelícula novedosas.²

Deepak Dwivedi y Gaurav Khandelwal (2012)

Evaluaron la eficacia del extracto de hierbas crudas de *Mentha arvensis* en patógenos cariogénicos. En este estudio se obtuvo extracto crudo de la *Mentha arvensis* en diferentes disolventes 50% y 10% de metanol, acetato de etilo, cloroformo y se puso a prueba en contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei* que fueron aisladas de pacientes con enfermedades dentales. La actividad de los extractos crudos fue estudiada por difusión en discos y ambos métodos de dilución en concentración diferente. Los estudios se llevaron a cabo también para evaluar la composición fitoquímica del extracto de la *Mentha arvensis*. El 50% de extracto de metanol en el 2.5mg/ml y la concentración de 5mg/ml muestra una zona alta de inhibición (que varía de 26 a 30 mm y 28 a 32 mm), y el 10% y el extracto metanólico 2.5mg/ml

5mg/ml se ve una pequeña zona (que van desde 20 a 24 mm y 22 a 27 mm) y la comparación con acetato de etilo y cloroformo muestra pequeña zona en el 5mg/ml que van desde 15 a 18 mm y 13 mm a 17 y en el 2.5gm/ml que van desde 14 a 15 mm y de 09 a 16 mm o para ser moderadamente sensibles. MIC resultados muestran la actividad profunda y prometedora de *Mentha arvensis* en BHI 0,090 mg / ml. Los metabolitos secundarios comúnmente presentes en las hojas de prueba son alcaloides, taninos, flavonoides con esteroides, Xantonos y glucósidos, el análisis de GC-MS reveló la presencia de eucaliptol, Isomethone, linalol, methnol, 4-terpineol, OleicAcid, ácido tetradecanoico, 12-metil éster metílico, ácido hexadecanoico, (ácido palmítico) éster metílico.

Estos datos sugieren que los extractos de *Mentha arvensis* contienen cantidades importantes de fitoquímicos con propiedades antioxidantes que podrían servir como propiedad antimicrobiana de la *Mentha arvensis* y es explotado como una fuente potencial de productos basados en plantas farmacéuticas. Concluyeron que estos resultados podrían constituir una base sólida para una mayor investigación en el descubrimiento potencial de un nuevo compuesto bio activo natural.³

Hajlaoui H. y Col.

Se estudió la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha longifolia*. *Ssp longifolia*. La concentración mínima inhibitoria (CIM) de este aceite *contra cuatro bacterias Gram + y Gram-* de referencia, incluyendo las bacterias *Salmonella typhi murium LT2*, *Escherichia coli* ATCC35218, *Microoccus luteus* NCIMB8166 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue utilizada para el estudio de la alteración morfológica de la pared celular bacteriana visualizado por microscopía de fuerza atómica (AFM). El análisis químico del aceite esencial mostró la presencia de 34 compuestos. Los más importantes son: mentol (32,51%), mentona (20,71%), pulegona (17,76%), 1,8 cineol (5,61%), terpineol-4 (4,87%) y piperitona (2,16%). La MIC para bacterias osciló desde 0,19 hasta 1,56mg / ml. Hemos encontrado que *M. longifolia* (Mentol quimiotipo) tiene un

efecto antibacteriano alto. La pared celular de las bacterias analizadas fue dañada en concentraciones MIC. Esta susceptibilidad es más acentuada en *S. typhimurium* y *E. coli* (bacterias de barra), mientras que el daño es menos importante en las bacterias cocoides (*S. aureus* y *M. luteus*).⁴

Djenane D. y Col.

Los aceites esenciales (EO) de *Lavandula angustifolia* L. y *Mentha piperita* L. se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC / MS). Los principales componentes fueron linalol (22,35%), acetato de linalilo(21,80%), transocimeno (6,16%) y 4-terpineol (5,19%) para *L. angustifolia* y mentol (33,28%), mentona (22,03%), y acetato de mentilo(6,40%) de *M. piperita*. La actividad antibacteriana in vitro de ambos aceites empleados frente a *E. coli* O157: H7y *Staphylococcus aureus* CECT4459 mostró una inhibición alta frente a *S. aureus*. Las concentraciones mínima inhibitoria (CMI) se obtuvieron con *L. angustifolia* (0.25µL/mL) contra *S. aureus* y *M. piperita* mostraron una CIM de 0.50µL/mL contra ambos microorganismos. Causó una disminución significativa del crecimiento bacteriano en carne picada de vacuno ($p < 0,05$)⁵

Sabahat S. y Col.

Se investigaron las actividades antibacterianas de las diferentes formas de menta (*Mentha piperita*) es decir, acuosas. infusión, decocción, jugo y aceite esencial frente a 100 aislamientos pertenecientes a 11 diferentes especies de bacilos, *Escherichia coli* (30), *Klebsiella pneumoniae* (25), *Pseudomonas aeruginosa* (15), *Salmonella typhi* (5), *S. paratyphi* A (1), *S. paratyphi* B (1), *Proteus mirabilis* (10), *P. vulgaris* (2), *Shigella dysenteriae* (5), *Yersinia enterocolitica* (1), y *Enterobacter aerogenes* (5). La detección se realizó por el método estándar de difusión en disco. El aceite esencial de menta muestra mayor actividad antimicrobiana con

11,78 mm media zona de inhibición. El jugo de menta también posee actividad antibacteriana con 10,41 mm zona de inhibición, mientras que todos los aislados eran totalmente resistentes a la infusión acuosa y cocimiento de menta.⁶

Juan Rojas y col. (2010)

Se estudió la actividad anti *Trypanosoma cruzi* in vitro de los aceites esenciales de 10 plantas medicinales. Además, la actividad citotóxica de los aceites contra células de mamíferos y la actividad moduladora de los aceites sobre el óxido nítrico. Realizaron un estudio experimental in vitro. Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, células Raw 264.7, aceites esenciales de *Mentha X piperita* L (menta), *Rosmarinus officinalis* L (romero), *Chenopodium ambrosioides* L (paico), *Eucaliptus globulus* Labill (eucalipto), *Artemisia absinthium* L (ajenjo), *Melissa officinalis* L (toronjil), *Minthostachys setosa* Brig (muña), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Aloysia triphylla* (cedrón) y *Mentha spicata* L (hierba buena). La actividad tripanocida se evaluó contra epimastigotes cultivados en medio LIT, incubados por 48 horas a 37°C en incubadora humidificada con CO₂ al 5%. El cristal violeta se utilizó como control positivo. La actividad citotóxica de los productos contra células mamíferas se evaluó en células RAW 264.7 y la actividad moduladora de los compuestos sobre óxido nítrico también se determinó en los cultivos de células RAW 264.7. Los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Aloysia triphylla* (cedrón) inhibieron significativamente el crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi*, con una CI₅₀ de 63,09 y 96,49 µg/mL, respectivamente. No hubo variación significativa de la concentración de óxido nítrico y tampoco se evidenció citotoxicidad. Concluyeron que los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Aloysia triphylla* mostraron actividad anti *Trypanosoma cruzi* in vitro y no fueron citotóxicas para las células mamíferas.⁷

Sabahat S. y Col (2005)

Los extractos de las hojas y el tallo de *Mentha piperita* (menta), la piel y las semillas de *Pisum sativum* (arveja), la piel y la pulpa de *Momordica charantia* (melón amargo) fueron seleccionados para actividad antibacteriana contra 56 cepas pertenecientes a 11 especies diferentes de bacterias Gram-negativas bacilos: *Escherichia coli* (19), *Klebsiella pneumoniae* (11), *Pseudomonas aeruginosa* (9), *Salmonella typhi* (3), *Salmonella paratyphi A* (1), *Salmonella paratyphi B* (1), *Proteus mirabilis* (5), *Proteus vulgaris* (1), *Enterobacter aerogenes* (4), *Shigella dysenteriae* (1), y *Yersinia enterocolitica* (1). La detección se realizó por el método de difusión en pocillo. Las hojas de *M. piperita* mostraron mayor actividad antimicrobiana (zona media de la inhibición de 17,24 mm \pm 0,87 SD), mientras tallo de *M. piperita* exhibió actividad antibacteriana al (zona media de la inhibición de 15,82 mm \pm 3,56 SD). La piel y las semillas de *P. sativum*, la piel y la pulpa de *M. charantia* exhibió buen antibacteriano actividad con la zona media de la inhibición de 16,30 mm \pm 2,02 SD, 16,39 mm \pm 3,16 SD, 16,16 mm \pm SD 2,17 mm y 15,88 \pm 2,24 SD respectivamente. ⁸

Padmini E. y Col (2010)

Se estudió la actividad antibacteriana de los extractos acuosos de menta, té y té enriquecida con menta y correlacionados los resultados con sus componentes minerales y componentes biológicamente activos.

Se determinó propiedades antibacteriana de extractos de plantas por el método de difusión en agar gel contra microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. El contenido mineral se determinó por espectrofotometría y los componentes químicos de los extractos fueron identificados por HPLC y GC-MS.

Los extractos de plantas preparados demostraron propiedad antibacteriana significativa, con el efecto máximo se observa a la menta. El contenido mineral fue alta en el extracto de té enriquecido con menta. Los principales componentes químicos ricos en propiedades antibacterianas identificado by HPLC ha

demostrado la presencia de ácido rosmarínico, luteolina y ácido cafeico en menta; galato de epigallocatequina, galocatequina y catequinas del té. GC-MS análisis mostraron la presencia de mentona, isomentona y ácido hexadecanoico en menta, caffeine, octadecenal y fitol en el té.

El estudio muestra que los extractos de plantas exhibe un efecto antibacteriano significativo, la bioactividad se asocia con contenido de minerales y componentes biológicamente activos. Por lo tanto estos extractos de plantas con la característica de biodisponibilidad y retención de ciertos minerales por compuestos polifenólicos puede ser recomendado para su utilización como una alternativa agente anti-infeccioso en la medicina natural para el tratamiento de enfermedades infecciosas.⁹

Habiba B. y Col. (2011)

Realizaron análisis y la identificación de los aceites esenciales hidrodestilados de dos especies de menta (*Mentha spicata* y *Mentha pulagium*) por medio de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Además, se tamizó su actividad antagonista frente a algunas bacterias patógenas. De aceites esenciales de hojas de *Mentha spicata* se separaron 57 compuestos, lo que representa 97.022% del total masa aceite esencial, de los cuales 44 fueron compuestos identificados. El compuesto principal fue carvona (59,40 %), Otros componentes presentes en contenidos apreciables fueron: limoneno (6,12%), 1,8-cineol, germacreno- D (04,66%), β -cariofileno (2,969%), β -bourbonène (2,796%), α -terpineol (1,986%), terpineno-4-ol (1,120%). Del aceite esencial de *Mentha pulegium*, se separaron 43 compuestos, lo que representa 99,52% de la masa total del aceite esencial de la que 29 compuestos fueron Identificados. El componente principal era pulegona (38,815%), otros componentes presentes en contenidos apreciables fueron: mentona (19,240%), piperitenona (16,528%), piperitona (6,348%) y isomentona (6,096%), limoneno (4,293%), Octaan- 3-ol (1,854%). Además, la selección de los dos aceites esenciales para su actividad antagonista contra bacterias patógenas revela que no tienen una actividad

apreciable excepto la observada frente *Streptococcus pyogenes* (20 y 16 mm para *M. spicata* y *M. Pulagium* respectivamente).¹⁰

Cynthia W. y Col

La actividad antibacteriana fue examinada en tres productos a base de hierbas y de diez plantas medicinales seleccionadas: *Ziziphus vulgaris*, *Malva sylvestris*, *Onosma bracteatum*, *Hyssopus officinalis*, *Efedra gerardiana*, *Cordia latifolia*, *Althaea officinalis*, *Mentha piperita*, *glabra*, *Glycyrrhiza*, *Justica adhatoda*. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar; extractos crudos se obtuvieron mediante el uso de metanol como disolvente de extracción. Cinco concentraciones (15 mg / ml, 12,5 mg / ml, 10 mg / ml, 7,5 mg / ml y 5 mg / ml) se utilizaron para comprobar la actividad antibacteriana de extractos de plantas. Cada muestra de planta fue probado contra un Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*) y dos bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). La mayoría de los extractos de plantas mostraron actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram-positiva. El orden de actividad antibacteriana fue *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. Las zonas máximas de inhibición se observaron en *Hyssopus officinalis* ($3,37 \pm 0,05$ mm) frente a *S. aureus*, *Glycyrrhiza glabra* ($3,6 \pm 0,3$ mm) contra *E. coli* y *Justica Adhatoda* ($2,67 \pm 0,06$ mm) contra *P. aeruginosa*. Producto herbal 1 mostraron actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* ($2,93 \pm 0,15$ mm), *S. aureus* ($2,2 \pm 0,1$ mm) y *E. coli* ($1,33 \pm 0,21$ mm). Producto herbal 2 mostró actividad antibacteriana contra *S. aureus* ($2,93 \pm 0,15$ mm), *P. aeruginosa* ($2,1 \pm 0,1$ mm) y *E. coli* ($1,33 \pm 0,11$ mm). Producto herbal 3 era también eficaz contra *S. aureus* ($2,6 \pm 0,1$ mm), *P. aeruginosa* ($2,33 \pm 0,51$ mm) y *E. coli* ($1,33 \pm 0,15$ mm). Los tres productos herbales mostraron actividad antibacteriana significativa.¹¹

Kalp G.y Col. (2002)

Se investigaron los aceites esenciales de menta piperita *Mentha piperita* L. (Lamiaceae), que se utilizan en sabores, fragancias, y productos farmacéuticos, fueron investigados por sus propiedades antimicrobianas contra 21 microorganismos patógenos para humanos y vegetales. La bioactividad del mentol y aceites mentona se comparó utilizando la combinación de técnicas in vitro, tales como microdilución, difusión en agar, y bioautografía. Se demostró que todos los aceites de menta tamizadas, presentan fuerte inhibición para microorganismos patógenos para las plantas, mientras que para los patógenos humanos fueron sólo moderadamente inhibido. La composición química de los aceites fueron analizados por GC y GC / MS. Usando el ensayo de bioautografía, mentol se encontró que era responsable de la actividad antimicrobiana de estos aceites.¹²

Abhishek M. y Col. (2011)

Se usó extracto de raíz de metanol de *Mentha piperita* L. para evaluar la actividad antioxidante, antimicrobiana y propiedades anti-inflamatorias. Se encontró el extracto posee la máxima potencia contra agentes patógenos infecciosos. Además la máxima capacidad antioxidante se observó en extractos de metanol. El extracto de metanol de las raíces de la planta también poseía máxima actividad anti-inflamatoria, en el modelo de carragenina los animales, inducida en forma dependiente de dosis a una dosis de 50 mg / kg. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Diferentes otros extractos no mostraron ninguna potencia en comparación con otros extractos de disolvente de la planta. Estos extractos activos de metanol crudo se ensayaron también para la toxicidad celular de los eritrocitos de oveja y se encontró que no tienen toxicidad celular.¹³

Abhishek M. y Col (2011)

Se aisló un compuesto antimicrobiano y se caracterizó, y se evaluó su actividad biológica. El compuesto fue aislado y caracterizado a partir del aceite esencial extraído usando diferentes técnicas espectrales: TLC, los espectros FTIR y HPLC. La actividad antimicrobiana de los el compuesto se evaluó utilizando tanto la difusión y así el método de microdilución en placas de microtitulación de 96 pocillos múltiples. El compuesto aislado fue investigado por su actividad antimicrobiana contra siete microorganismos patógenos y no patógenos seleccionados: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli K-12*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y las cepas de hongos *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* y *Saccharomyces cerevisiae*. Mentol a diferentes concentraciones (1:1, 1:5, 1:10, y 1:20) era activo contra todas las bacterias probadas excepto para *S. aureus*, y el mayor efecto inhibidor se observó contra *S. mutans* usando el método de difusión en pocillo. Además, mentol logró considerable actividad antifúngica contra todas las cepas de hongos, excepto *A. niger*. Concluye que el aislamiento de un compuesto antimicrobiano de *M. piperita* hojas (mentol) valida el uso de esta planta en el tratamiento de de la garganta dolorida leve y menores de la boca o irritación de la garganta, así como enfermedades como la fiebre tifoidea.¹⁴

2.2 Bases teóricas

2.2.1.- Fitoterapia.

La fitoterapia es la terapia basada en plantas, alimentos y elementos nutritivos. Se encuentra entre las más antiguas y quizá sea una de las más fáciles de comprender de todas las terapias disponibles. Los antiguos tratantes y recolectores de hierbas, cuya cultura dependía de la flora del lugar, son conocidos ahora como terapeutas herbales o fitoterapeutas. Esta terapia utiliza esencias puras de plantas para tratar diversos problemas, así dermatológicos, alérgicos,

digestivos, ginecológicos, etc. Disminuyendo los efectos secundarios y haciendo más efectivos los tratamientos. La fitoterapia a través de los extractos naturales y sus destilaciones artificiales constituye la base de la medicina moderna y de la cosmética actual.¹⁵

2.2.2.- Historia de las plantas naturales

No sabemos quién utilizó las plantas por primera vez pero se sabe que multitud de pueblos descubrieron ya en tiempos remotos, que algunas plantas eran buenas para comer y alimentarse y otras se caracterizaban por tener propiedades curativas. Con toda certeza, la búsqueda de algún remedio fue la génesis del uso de las plantas para su propio beneficio, ya fuera fruto del deseo de sanar o por cuestión mágico-religiosa, siendo simplemente en la mayoría de los casos con motivo de la búsqueda de nuevos alimentos. Los antepasados se vieron en la circunstancia de tener que probar los alimentos nuevos en su propio cuerpo, descubriendo que muchos de ellos eran verdaderamente comestibles, otros venenosos y otros producían diferentes efectos, así, aumentaban el sudor, eliminaban el dolor de las articulaciones, les hacía defecar con mayor facilidad, etc. Las propiedades y efectos de las plantas debieron constituir un misterio en las comunidades primitivas, consiguiendo aquel que se interesara por la materia (O bien a través de la experiencia adquirida), gran reconocimiento social al respecto, pudiendo conjugar la intervención divina en el efecto terapéutico de las plantas y la curación de las dolencias. Es ya en la prehistoria donde mediante la observación de los animales al utilizar las plantas, (ej. perros y gatos utilizaban la grama para purgarse), donde se estima que el hombre de Neardenthal empezó en la práctica y uso de las plantas medicinales. En ausencia de escritura, los conocimientos se transmitían de forma verbal, descubriéndose el primer escrito que ofrecía datos al respecto datado en unos 4000 años de antigüedad, recogiendo los mismos en una tablilla de arcilla, correspondiendo a la civilización Sumeria su inscripción, la cual estaba asentada en los ríos Eufrates y Tigris (la actual Irak).¹⁵

China, Asia, Egipto, Mesopotamia

Los egipcios, desarrollaron la utilización de las plantas medicinales de forma sistemática y estructurada, conociéndose más de 700 fórmulas en las que aparecen plantas curativas, destacando el impreso más importante, el *Papiro de Ebers*, 1700 A.C., pudiendo atribuirle un origen anterior en Asia. En China se supone que ya era utilizada en el 5000 A.C., destacando el libro de Pen Tsao que recoge el estudio de más de 300 plantas.¹⁵

En la India se menciona la utilización de las plantas medicinales en *Rig Veda*, uno de los libros sagrados del brahmanismo. El *Ayurveda* o como se conoce el uso de las plantas medicinales en la India, hace referencias escritas al año 800 A.C., describiendo unas 800 especies. La medicina Ayurvédica, constituye una forma de vida con la fusión de medicina, religión, filosofía y ciencia proponiendo unos hábitos de vida saludable para conseguir una salud plena. El conocimiento de las plantas medicinales se extendió desde el Antiguo Egipto y Mesopotamia hacia los países mediterráneos, hasta Grecia y luego por toda Europa para llegar 2000 años más tarde al Nuevo Mundo.¹⁵

Grecia y Roma

La civilización griega y romana recogió los conocimientos en plantas medicinales procedentes de Mesopotamia y Egipto. Así, Hipócrates, considerado el padre de la medicina, otorga gran importancia a las plantas curativas, siendo autor del aforismo, "*Deja que la comida sea tu medicina y tu medicina tu comida*".¹⁵

El primer escrito de la época clásica en materia médica fue escrito por Dioscórides (40-90 D.C.), haciendo referencia a las propiedades de más de 1000 plantas,

siendo su obra de referencia hasta el siglo xv, haciéndose sobre su obra multitud de revisiones y traducciones.¹⁵

Edad Media

Durante la Edad Media el estudio de las plantas estaba en manos de monjes que en sus monasterios cultivaban y experimentaban, (recogiéndose las plantas en días señalados), acompañándose la recolección con oraciones que relacionaba esta actividad con la magia y/o las ideas astrológicas.¹⁵

El Nuevo Mundo

Los colonizadores europeos se llevaron gran sorpresa al ver el gran conocimiento de los nativos en las plantas medicinales, los cuales estaban depositados en los *Chamanes*, que eran los que las utilizaban junto con la magia para curar enfermedades. Los aztecas reciben una gran herencia en conocimientos de hierbas y plantas para uso médico, (algo así como tres mil distintas usaban), resultando explicables tantos remedios vegetales populares y de uso actual, los cuales fueron estudiados y clasificados plasmando sus conocimientos en obras descriptivas e iconográficas relativas a las propiedades terapéuticas de infinidad de plantas y transmitirlos hasta la actualidad, como así llevaron a cabo el médico del monarca Felipe II, Dr. Francisco Hernández, para estudiar la flora y fauna de México, realizando una obra de 16 volúmenes al respecto.¹⁵

Las plantas medicinales en el mundo de hoy

El conocimiento de las plantas medicinales, ya sea a través de la magia, religión, necesidad o casualidad, o a veces como consecuencia del ensayo-error ha

permitido obtener un conocimiento de las plantas medicinales entre las diferentes culturas que constituyen la base de la medicina moderna, sabiduría que nos corresponde a todos conocer y salvaguardar como parte de nuestro patrimonio. En la actualidad ha resurgido el interés público y científico en el desarrollo de la medicina natural tradicional con el impulso de nuevas tecnologías que descubren cada día nuevas propiedades y aplicaciones a los diferentes principios activos de las plantas, subrayando el carácter dinámico y de servicio en beneficio de la humanidad en el estudio de las plantas medicinales.¹⁵

Aceites esenciales

Son llamados así los constituyentes odoríferos o “esencias” de una planta. El término aceite, probablemente, se origina del hecho que el aroma de una planta existe en las glándulas o entre las células en forma líquida, el cual al igual que los aceites grasos son inmiscibles con el agua. La palabra esencial fue derivada del latín “quinta essentia” que significaba el quinto elemento, asignado a estos aceites, ya que la tierra, el fuego, el viento y el agua, fueron considerados los cuatro primeros elementos.⁵³

Son mezclas de sustancias orgánicas químicamente constituidas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que se localizan en determinados órganos de la planta como flores, hojas, frutos; y se les obtienen por destilación dependiendo del método y la condición del vegetal, destacándose entre ellos el de arrastre con vapor de agua. Son líquidos solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua.²⁵

Propiedades Generales de los aceites esenciales

- Líquidos a temperatura ambiente.

- Volátiles.
- Aromáticos.
- Incoloros o amarillentos.
- Menos densos que el agua (canela y clavo: más densos que el agua)
- Insolubles en agua.
- Lipófilos.
- Solubles en disolventes orgánicos.
- Solubles en alcoholes de alta graduación.
- Índice de refracción elevado.
- Extraíbles por arrastre de vapor de agua o expresión.
- Poder rotatorio (quirales).⁵³

Mecanismo de acción del aceite esencial sobre los microorganismos

El mecanismo de acción hacia los microorganismos es complejo y aún no ha sido del todo entendido y explicado. El modo de acción de los (AE) también dependerá del tipo de microorganismos y esta principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos.⁵³

Aplicaciones de aceites esenciales.

Las aplicaciones de los aceites esenciales son muy variadas: son ampliamente utilizados en perfumería, como saborizantes de alimentos y en medicina. Ejemplo: los aceites esenciales de anís, menta y canela son carminativos y soporíferas; el de clavo de olor es analgésico.⁵³

2.2.3.- Aspectos Botánicos

2.2.3.1.- Clasificación sistemática

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist (1988), la especie vegetal que es motivo de la presente investigación, tiene la siguiente clasificación taxonómica:

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GÉNERO: *Mentha*

ESPECIE: *Mentha spicata* L.

Nombre vulgar: "Menta"

Constancia de clasificación taxonómica anexo 1

2.2.3.2.- Descripción del género *Mentha*

El género *Mentha* pertenece a la familia Lamiaceae (Labiadas) y está compuesto por unas 25 especies, que se pueden hibridar con suma facilidad; además presenta una gran plasticidad morfológica y genética, lo que hace, en numerosos casos, que no se pueda conocer con precisión los límites de cada especie; por todo ello existen notables discordancias entre los autores del género. Dicha plasticidad hace posible la existencia de múltiples "tipos" locales, posteriormente fijados, que dan lugar a numerosas variedades de cultivo.¹⁷

Son especies herbáceas con aceites esenciales, lo que ha hecho que hayan sido cultivadas desde hace mucho tiempo como saborizantes (los romanos ya usaban la *M. aquatica* L. y la *M. longifolia* L. Hudson se supone que era la menta que se cita en la Biblia ya que se cultivaba abundantemente en Oriente Medio).¹⁷

En la actualidad los cultivos más comunes son de las siguientes especies:

- *Mentha. spicata L.*
- *Mentha. arvensis L.*
- *Mentha. pulegium L.*
- *Mentha. piperita L.*
- *Mentha. gentilis L.*
- *Mentha. longifolia L.*

Partes medicinales: El aceite extraído de las partes aéreas de la planta, las hojas secas, las puntas de las ramas florecientes, la planta fresca floreciente, y la planta entera, constituyen las partes medicinales de la Menta. ¹⁶

Flor y fruto: Las flores son esquinas falsas con numerosas brácteas que destacan poco. El cáliz es de forma tubular con un anillo de cabellos. La corola es de color violeta y posee un margen plano dividido en cuatro partes. ¹⁶

Hoja, tallo y raíz: La planta es perenne, mide de 50 -90 cm. Los tallos están usualmente ramificados y tienen un color violeta. Las hojas presentan forma rectangular-ovoide y son serradas. ¹⁶

Tolerancia: Es una especie que se desarrolla bien en zonas de clima templado, con elevada luminosidad, son tolerantes a heladas. ¹⁷

Suelo: Se desarrolla en gran variedad de suelos, pero son favorables los ligeros, areno – arcillosos, francos, que sean fértiles, profundos y bien drenados. Si el suelo es arcilloso, el crecimiento de la planta resulta defectuoso y su rendimiento disminuye. Son desfavorables los terrenos en los que se estanca el agua. Se cultiva desde el nivel del mar hasta los 3,800 msnm, es una planta que requiere elevada luminosidad. Los suelos humosos (negros) son los más recomendables por contener bastante materia orgánica. ¹⁷

Orígenes: Centro de origen: Europa y África del norte; con amplia presencia en Asia y América.¹⁷

Composición Química: Las hojas contienen de 10 a 12 % de elementos minerales, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos. Contiene de 0.5 % a 1 % de aceite esencial. Según el análisis realizado en la Comunidad de Tranca (Ayacucho) reporta 2.5 % de aceite esencial.¹⁷

El contenido de aceites esenciales, oscila entre 1.3 y 2.1 %. La menta negra (menta piperita var. Micham) cultivada en el Departamento de Ayacucho tiene alto contenido de aceite esencial, esta por encima de los estándares europeos.¹⁷

El aceite esencial de la menta, es un líquido incoloro con olor fuerte y sabor picante que se halla localizado en glándulas pequeñas situadas en la superficie superior e inferior de las hojas; los tallos contienen en mínima proporción aceite.

El principal componente de la esencia es el mentol, que se halla en la proporción de 45 a 70 %.¹⁷

Compuestos activos

La química del aceite de menta es compleja. Más de 100 compuestos han sido encontrados en el aceite y la concentración relativa de cada uno depende grandemente de la localización geográfica.²¹

Los extractos de la menta deben protegerse de la luz.²²

La planta puede contener entre un 0.1% y un 1% de aceite volátil el cual está compuesto principalmente de mentol, mentona, metilacetato.^{20,21}

Componentes de las hojas

Aceite volátil, entre los principales compuestos pueden citarse: mentol (35-45%), mentona (15-20%), acetato de mentil (3-5%), isomentona (2-3%) neomentol (2.5-3.5%) mentofurano 2-7%); también pueden hallarse llimonen, pulegona, el alfa y

beta – pinene, y el trans – sabinene hidratado, además contiene jasmona, taninos y principio amargo.^{20, 21}

Ácido caféico, incluyendo entre otros el ácido rosmárico.¹⁸

Flavonoides, apigenina, diosmetina y glicosidos de luteolina, flavonoide metoxilado lipofílico libre, además de xantomicrool y gardenia D, entre otros.¹⁸

Farmacología:

El aceite de menta es un carminativo aromático que reduce la presión intracolónica y alivia la flatulencia.^{18, 22}

Es un agente antibacterial, insecticida, colerético y secretolítico, además tiene un efecto refrescante en la piel.¹⁸

Es capaz de bloquear el estímulo exitatorio del calcio debido a su característica antiespasmódica propia de los bloqueadores de canales de calcio que presenta el mentol, por lo que presenta una actividad antiespasmódica a nivel del músculo liso del tracto gastrointestinal.^{18, 22}

Algunos reportes han sugerido la utilidad del aceite de menta, bajo una forma dosificada con cubierta entérica, en el síndrome del colon irritable, por medio de una acción meramente local sobre el tracto gastrointestinal.^{19, 22}

Produce efecto relajante sobre los músculos de las vísceras y es por esta razón que se inyecta el aceite a una solución diluida del mismo para reducir el espasmo colónico que se presenta durante la endoscopia²²; es antifatulenta y estimula la producción de bilis y la secreción de jugos digestivos, lo que la convierte en un buen remedio para los cólicos intestinales y de la digestión difícil y fatulenta.²⁰

El aceite volátil que contiene actúa como anestésico suave del estómago lo que ayuda a combatir las náuseas y vómitos.¹⁶

El aceite de menta ha sido utilizado, junto con otros aceites volátiles en preparaciones para desórdenes respiratorios.²²

También alivia los dolores de cabeza producidos por la mala digestión. Tiene acción tranquilizante sobre los nervios, por lo que se puede utilizar en caso de tensión nerviosa, ansiedad e histeria. Alivia los dolores menstruales y disminuye la tensión relacionada con ésta condición. Para aliviar las molestias nerviosas se puede combinar con tilo, manzanilla o valeriana. La infusión de menta puede remplazar al té y el café.²⁰

Las hojas de menta tienen un efecto sedante leve, además presenta propiedades antivirales, antimicrobiales, diuréticas, actúa como colerético, carminativo y antiespasmódico.¹⁸

2.2.3.3. Usos e indicaciones.

Hojas de menta

Usos

- a. Enfermedades del hígado y la vesícula biliar.¹⁸
- b. Problemas dispépticos.¹⁸

La droga que es empleada en problemas convulsivos del tracto gastrointestinal, así como de la vesícula biliar y de los conductos biliares.¹⁸

Aceite de menta

Usos

Son varios los usos del aceite de menta que ya han sido aprobados, algunos de ellos son:

- a. Resfriado común.
- b. Tos y bronquitis.
- c. Fiebre y resfriados.
- d. Inflamación de la boca y la faringe.
- e. Tendencia a infección.

f. Problemas dispépticos.¹⁸

Se ha utilizado de forma interna para diferentes condiciones entre las cuales pueden citarse: calambres de la zona superior del tracto gastrointestinal y los conductos biliares, colon irritado, catarro (tracto respiratorio) e inflamación de la mucosa oral y faríngea.¹⁸

2.2.3.4. Contraindicaciones.

Hojas de menta: Se encuentran contraindicadas en pacientes que presentan cálculos biliares.¹⁸

Aceite de menta: Las contraindicaciones para la administración interna de la droga incluyen; oclusión de los conductos biliares, inflamación de la vesícula biliar y daño severo del hígado.¹⁸

Las personas que padecen de cálculos biliares podrían experimentar cólicos debido al efecto colerético.¹⁸

2.2.3.5. Precauciones y reacciones adversas

Hojas de menta: No se han reportado efectos secundarios que amenacen la salud si la droga es administrada de manera adecuada y en las dosis terapéuticas establecidas.¹⁸

El efecto colagógico podría generar cólicos en aquellos pacientes que presentan cálculos biliares.¹⁸

Aceite de menta:

General: No se notifican efectos adversos si la administración del mismo y su dosis son las adecuadas.¹⁸

En personas susceptibles la administración puede conducir a problemas gástricos. El aceite volátil posee un débil potencial de sensibilización debido a su contenido de mentol¹⁸

No se recomienda la administración si hay tendencia a reflujo gastroesofágico.¹⁸

Uso pediátrico: Las preparaciones que contiene el aceite no deben ser aplicadas en el rostro de infantes o niños pequeños (particularmente en el área nasal). Debido a posibles espasmos de tipo bronquial, ataques de asma o inclusive, fallo respiratorio.¹⁸

2.2.3.6. Toxicidad.

El aceite de menta puede ser irritante y raramente ocasiona reacciones de hipersensibilidad. Las reacciones reportadas incluyen rash cutáneo eritematoso, cefalea, bradicardia, tremor muscular y ataxia. También se ha reportado pirosis.²² Estas reacciones alérgicas han sido atribuidas al mentol.²¹

No se debe usar durante más de 12 días seguidos porque puede causar daño al corazón.²⁰

La aplicación de preparaciones que contengan mentol, en niños menores de 2 años, para el tratamiento de los síntomas del resfriado puede causar colapso.²¹

Las tabletas entéricas no deben ser administradas inmediatamente después de las comidas o de haber ingerido un antiácido.²²

Tampoco se debe utilizar en individuos que presentan obstrucción en el tracto biliar, colecistitis, piedras en vejiga, hernia hiatal o daño severo en el hígado, ya que puede haber empeoramiento de la condición.²¹ Se ha observado actividad bloqueadora de los canales de calcio en modelos animales por lo que se debe

usar con cuidado en individuos que utilizan agentes con la misma acción. Utilizar con extrema precaución en niños menores de años, en mujeres embarazadas o en estado de lactancia, en personas que están dentro de algún grupo de riesgo o están tomando otros medicamentos en forma concomitante ni en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad.¹⁹

Algunos efectos secundarios son: náuseas, vómitos e irritabilidad gastrointestinal,¹⁹ reacciones alérgicas (caracterizado por dermatitis, rubor y cefalea).²¹ También se ha reportado casos de lesiones cerebrales en ratas que ingirieron una sobredosis del aceite.²¹

Sobredosis: No se han reportado casos de envenenamiento. La dosis mínima letal de mentol está estimada en los 2g, sin embargo algunos individuos han sobrevivido a dosis superiores a los 8-9g.²⁰

2.2.4 Microorganismos de la cavidad oral.

2.2.4.1.- Generalidades.

La boca alberga innumerables microorganismos en un ecosistema de complejidad considerable que todavía no ha sido investigado en su totalidad y está lejos de ser comprendido en toda su magnitud. Hasta hace muy poco, la boca se consideraba como un hábitat simple para los microorganismos pero en la actualidad se reconoce que los dientes, el surco gingival, la lengua, otras superficies mucosas y la saliva, todos forman hábitats o sitios diferentes donde los microorganismos se multiplican. Cada zona o hábitat contiene su propia población característica, a menudo, con muchas especies microbianas distintas, las cuales pueden complementarse o competir con otras en la misma población, por tanto, la flora bucal es una entidad dinámica afectada por numerosos cambios durante la vida del huésped.²³

2.2.4.2.- Desarrollo de la flora bucal:

Por lo general, la boca del feto á término es estéril, aunque al nacimiento puede adquirir microorganismos transitorios a partir de la vagina. La boca del niño recién nacido adquiere microorganismos con rapidez, de la madre y también del ambiente.²³

Pueden aislarse varias especies de *Streptococos* y *Estafilococos*, junto con *Coliformes*, *Lactobacilos*, especies *Bacilos*, especie *Neisseria* y *Levaduras*. La selectividad de la boca como un entorno se demuestra aún en este momento, ya que la mayor parte de los organismos introducidos no logra establecerse. El más común, que se aísla de la boca de los recién nacidos, es el *Streptococcus salivarius* y junto con el *Staphylococcus albus*, la especie *Neisseria* y la *Veillonella* forman el conglomerado inicial. En ocasiones, *Candida albicans* se multiplica con rapidez en la boca y el pH bajo que se produce impide el crecimiento normal de otros comensales. Una proliferación excesiva de levaduras produce lo que se conoce como "afta bucal"

Infancia y niñez:

El lactante se pone en contacto con una variedad siempre creciente de microorganismos, algunos de los cuales se establecerán como parte de la flora común del individuo. Los microorganismos comensales de otros sitios del cuerpo y los del ambiente, pueden existir también en la cavidad bucal y algunos se quedarán ahí. La erupción de los dientes temporales proporciona una superficie diferente para la adherencia microbiana y esto se caracteriza por la aparición del *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans* como habitantes regulares de la cavidad bucal. Con el aumento en el número de dientes y los cambios en la alimentación se modificarán las proporciones globales de los microorganismos. Unos cuantos anaerobios llegan a establecerse pero como el surco gingival no es

profundo, su número permanece pequeño. Habitualmente se encuentran *Actinomicetos*, *Lactobacilos* y *Rothia*.²³

Adolescencia:

Quizá el incremento mayor en el número de microorganismos en la boca se produce cuando hacen erupción los dientes permanentes. Estos tienen fisuras profundas en su superficie lo que hace que sean difíciles de desalojar. Los espacios interproximales son mucho mayores que en la dentición temporal pues los dientes tienen un "cuello" más pronunciado en la unión amelocementaria. El surco gingival es más profundo que en los dientes temporales y permite un incremento mayor en los microorganismos anaerobios. La especie *bacteroides* queda fijada en cantidad abundante, así como las especies *leptotrichia* y *fusobacterium* y las *espiroquetas*. Las lesiones de la caries dental crearán un ambiente nuevo en el cual surgirán algunos microorganismos, en especial, *Streptococos*. En términos ecológicos la flora del final de la adolescencia y el principio de la edad adulta, antes de la pérdida de los dientes, es el clímax del conglomerado microbiano.²³

Edad adulta:

Se considera que la complejidad de la flora bucal del adulto es quizá su característica principal. Puede haber cantidades variables de placa dental y el grado de enfermedad periodontal crónica estará en relación al número y tipos de microorganismos encontrados. Las lesiones cariosas y las restauraciones poco satisfactorias, propiciarán ambientes para acumulaciones locales de bacterias. La mayoría de los estudios de la flora bucal del adulto, muestra que existen variaciones considerables entre los individuos, en el número total de bacterias y en las proporciones de muchas de las especies; de hecho puede haber variación en un mismo individuo si se toman muestras en diferentes momentos.²³

De acuerdo con las tendencias observadas en el adolescente hay un incremento en la especie *bacteroides* y las *espiroquetas* con el avance de la enfermedad periodontal y la madurez de la placa dental. La placa superficial contiene numerosos *Estreptococos*, principalmente *Streptococcus mutans* y *sanguis*. También se aíslan con regularidad actinomicetos y otros filamentos Gram positivos y Gram negativos de posición taxonómica incierta. Conforme los dientes se pierden, el número de sitios disponibles para la colonización microbiana disminuye; se reduce la cantidad de bacterias y varias especies disminuyen en cantidades desproporcionadas. Los individuos edéntulos albergan pocas *espiroquetas* y *bacteroides* pero aumenta el número, de *levaduras*. Normalmente las *levaduras* se localizan en el dorso de la lengua y en el surco bucal superior. Las dentaduras postizas proporcionan un medio protegido en el cual las levaduras pueden multiplicarse y cubrir el paladar duro y la superficie acrílica de la prótesis dental.²³

2.2.4.3.- Factores que alteran el desarrollo de la flora bucal:

Para que un microorganismo se establezca en la boca, debe

- 1) Introducirse.
- 2) Ser retenido.
- 3) Ser capaz de multiplicarse en las condiciones existentes en la boca.

Introducción:

Aunque desde el nacimiento se introducen en la boca una extensa variedad de microorganismos, sólo ciertas especies son capaces de establecerse en ella. Muchos de estos organismos tienden a ubicarse en sitios particulares como labios, dorso de la lengua, paladar duro, otros tejidos blandos, surco gingival o dientes.²³

Retención:

La retención de los microorganismos, por lo general, está confinada a un sitio particular en la boca, probablemente como consecuencia de la interacción, a menudo compleja de los mecanismos de retención y desprendimiento.²³

Adherencia:

Algunas bacterias tienen la habilidad de adherirse a los tejidos blandos; *Streptococcus salivarius* puede adherirse a la mucosa del dorso de la lengua y también a otros tejidos blandos. Otros, en particular *Streptococcus mutans* y *sanguis*, se adhieren al esmalte debido a la producción de polisacárido extracelular por la bacteria. Es probable que algunos actinomicetos bucales se adhieran por medio de un mecanismo hialurónico mediado por ácidos. Otras bacterias pueden pegarse simplemente a la matriz extracelular producida por otros. Las bacterias que se adhieren débilmente como la especie *veillonella* se alojan en defectos del esmalte, fisuras oclusales y fósas donde se protegen de las fuerzas de desprendimiento.²³

Sitios protegidos:

Además de lo anterior, la matriz adherente de la placa dental proporcionará un ambiente protegido para las bacterias que no poseen mecanismo alguno de adherencia. No obstante, el sitio protegido de mayor tamaño es el surco gingival donde especies como *bacteroides*, *melaninogenicus* y las *espiroquetas*, pueden sobrevivir.²³

Fuerzas de desprendimiento:

Estas incluyen el flujo salival, el movimiento de la lengua y de los tejidos blandos y la acción abrasiva de los alimentos. La circulación del líquido del surco gingival y la fagocitosis en el surco también sirven para eliminar bacterias.²³

Multipliación:

Para permanecer como parte de la flora bucal, un microorganismo debe ser capaz de multiplicarse en el sitio particular en que puede ser retenido. Este fenómeno depende de cierto número de factores.²³

Disponibilidad de sustratos:

Para que las bacterias puedan proliferar, deben ser capaces de metabolizar los sustratos disponibles de la dieta o en los productos metabólicos de otros microorganismos que están en el mismo sitio o en uno próximo. El consumo abundante de carbohidratos en la alimentación tiene probablemente los efectos más importantes en el número creciente de bacterias bucales, en particular estreptococos. pH: El metabolismo de los organismos depende con frecuencia del pH y las bacterias inhibidas por el pH bajo no pueden sobrevivir en las condiciones ácidas de la placa dental o bajo la base de una dentadura postiza. *Bacteroides melaninogenicus* y la especie *veillonella* no toleran un pH menor de 5.5 aproximadamente, pero la especie *Lactobacillus* y *Candida albicans* pueden tolerar proporciones muy bajas de pH.²³

Oxidación o reducción en el medio circundante:

El potencial de oxidación-reducción (.Eh) del sitio es con frecuencia importante para determinar la naturaleza de la flora en ese lugar. Los organismos anaerobios como *bacteroides*, *fusobacterias*, *espiroquetas* y algunos *actinomicetos* sólo se desarrollarán en ambientes reductores. Los requerimientos para la reducción son variados; *actinomicetos*, la especie *Capnocytophaga* y la especie *Campylobacter* toleran un ambiente con menor reducción que el exigido por la especie *bacteroides*, las *fusobacterias* y en especial las *espiroquetas*. Un potencial bajo de oxidación-reducción sólo puede lograrse con facilidad en el surco gingival y en la

capa más profunda de la placa dental. De aquí se infiere la explicación del porqué las bacterias anaerobias están confinadas a esos sitios.²³

Interacciones microbianas:

La complejidad de las comunidades de microorganismos es resultado de cierto número de interacciones microbianas. Algunas son nutricionales como el proveer ácido paraaminobenzoico del *Streptococcus sanguis* para el *Streptococcus mutans* en ambiente reductor; el aporte de vitamina K por varios microorganismos para *Prevotella melaninogenicus*, que a su vez produce sustrato para el *Campylobacter sputorum*. Las espiroquetas dependen de varios factores producidos por Otras tantas bacterias, lo que quizá indica por qué estos microorganismos sólo pueden establecerse en los surcos gingivales después de que el resto de la flora normal se ha desarrollado. Algunas interacciones son más nocivas que benéficas para una especie secundaria; por ejemplo, la producción de peróxido de hidrógeno por *Streptococcus sanguis* inhibe a otros muchos *estreptococos* y anaerobios. Las sustancias inhibidoras denominadas bacteriocinas, que actúan sobre diferentes cepas de la misma especie o de especies relacionadas, se han observado entre los *Estreptococos* bucales y la especie *bacteroides*. La inhibición de un microorganismo por otro, puede dar como resultado un sitio vacante adyacente que puede ser colonizado por el primer microorganismo que logre proliferar. La competencia por ocupar todos los sitios disponibles en la boca confiere a la flora normal su naturaleza dinámica pero también beneficia al huésped al ayudarlo a impedir el establecimiento de un patógeno cualquiera que intente introducirse.²³

2.2.4.4.- Flora microbiana en la cavidad oral.

Labios:

En los labios hay una transición de piel a mucosa bucal y existen también cambios en la población bacteriana. Predominan el *Staphylococcus albus* y los micrococos cutáneos con cantidades abundantes de *Estreptococos* típicos de la boca. Si las comisuras de la boca se humedecen con la saliva, puede desarrollarse una queilitis angular de cuyo raspado es posible cultivar *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.²⁴

Mejilla:

Los resultados de los estudios varían uno de otro. Pero la bacteria predominante en la parte interior de la mejilla es el *Streptococcus milleri*: le siguen en frecuencia *Streptococcus sanguis* y *salivarius*. Es posible aislar levaduras de los portadores y otros microorganismos presentes en la saliva deberán ser lavados de la superficie de la mejilla, pueden además, ser retenidos por algún tiempo, por ejemplo *Haemophilus influenzae* y la especie *neisseria*.²⁴

Paladar:

El paladar duro presenta una flora estreptocócica semejante a la de la mejilla. Los *hemofilos* se encuentran con regularidad y los *Lactobacilos* son comunes. Los escasos anaerobios encontrados sobre membranas expuestas es casi seguro que no proliferan. Las *Levaduras* y los *Lactobacilos* aumentarán en forma muy importante en algunas personas que utilizan dentaduras postizas y la flora puede alterarse mucho cuando el paladar es protegido de la acción de la lengua y la saliva por la base de una prótesis. El paladar blando albergará bacterias de las vías respiratorias como *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Neisseria* y *Branhamella*. Los portadores de estreptococos B- hemolíticos con frecuencia tendrán los microorganismos en la úvula y en los pliegues palatogloso y palatofaríngeo.²⁴

Lengua:

La superficie dorsal queratinizada de la lengua es un sitio ideal para la retención de microorganismos. Aunque varía el número de *Streptococcus salivarius*. Es el microorganismo predominante y representa 20-50% de la flora cultivable total. *Streptococcus mitis* también es común y la especie *Haemophilus* ha sido aislada con regularidad. El dorso de la lengua es colonizado a menudo, con cantidades pequeñas de *Candida albicans*. El *Micrococcus mucilaginosus* es un microorganismo raro que semeja un *Estafilococo* pero produce una sustancia mucosa extracelular que puede explicar su retención sobre la lengua. El microorganismo representa 3-4% de la flora cultivable en la mayoría de los individuos y se aísla únicamente del dorso de la lengua.²⁴

Surco gingival:

La población bacteriana del surco gingival es quizá la más numerosa en toda la boca, con 1000-1011 microorganismos por gramo de peso húmedo de detritus gingivales. Se han hecho innumerables estudios de esta estructura muy relacionados con trabajos acerca de la placa dental, supra o sub-gingival. El surco gingival tiene una relativa protección de las fuerzas que desalojan a las bacterias; no obstante, el líquido crevicular en el surco proporciona un medio rico en nutrientes que permite que proliferen algunos de los microorganismos más delicados. El número exacto y las proporciones de los diversos microorganismos presentes en el surco gingival varían con las diferentes muestras y técnicas de cultivo.²⁴

Dientes:

Todos los dientes tienen microorganismos adheridos, usualmente en depósitos denominados placa dental. Las fuerzas para desalojar bacterias, tales como los alimentos, la saliva y los tejidos blandos, tienden a remover esta placa de las superficies lisas del esmalte, o bien, de áreas linguales palatinas y bucales. Estos

depósitos bacterianos se forman inicialmente como sigue: En las fisuras y fosas oclusales, En defectos del esmalte, En los espacios interproximales, Cerca del borde gingival. La cuenta viable de la placa dental sólo representa una proporción de la cuenta total. La variación en la composición de la placa es amplia, pero los *estreptococos* bucales, los bacilos, filamentos gran positivos y algunos anaerobios gram negativos siempre están presentes. ²⁴

Microbiología de Saliva.

La microbiota oral es muy compleja. La mucosa oral, el dorso de la lengua y la saliva constituyen tres de los principales ecosistemas primarios de la cavidad oral.

La saliva carece de microbiota propia y todos los microorganismos que se aíslan a partir de esta muestra tienen carácter transitorio que depende de la microbiota de otros microsistemas primarios. Predominan aquí, cocos Gram positivos anaerobios facultativos en un 44%; bacilos Gram positivos anaerobios facultativos en un 15% (Como *Actinomyces sp*) y cocos y cocos Gram negativos anaerobios estrictos en un 15% (*Veillonella*)

Distribución porcentual de microorganismos en saliva.

Microorganismos	Saliva
1. Cocos	65%
1.1 Gram + anaerobios facultativos	44%
1.2 Gram + anaerobios estrictos	3%
1.3 Gram – aerobios	3%
1.4 Gram – anaerobios estrictos	15%
2 Bacilos	35%
2.1 Gram + anaerobios facultativos	15%
2.2 Gram + aerobios	2%
2.3 Gram + anaerobios estrictos	7%

2.4 Gram – anaerobios facultativos	4%
2.5 Gram – anaerobios estrictos	7%

Los microorganismos que forman lo que se denomina flora de la saliva son todos los que se han desprendido de los sitios diversos de la cavidad bucal en donde se han asentado poblaciones bacterianas (piezas dentarias, lengua, mucosa de los carrillos y membranas mucosas de la faringe; La saliva del ser humano tiene aproximadamente 6000 millones (6×10^9) de bacterias por mililitro, entre las cuales están *Streptococos*, *Peptostreptococos*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacilos*, *Actinomyces*, *Espiroquetas*, Levaduras, Protozoarios y otras. Aunque se han realizado muchas investigaciones relacionadas con la flora bucal utilizando la saliva como substitutivo de la placa dentaria, las muestras de saliva no deben usarse para decidir los tipos y cantidades de bacterias de cada territorio de la cavidad bucal.²⁴

Las investigaciones realizadas para conocer la posible fuente de bacterias en la saliva indican que *S. salivarius* comprende 47% de los *Estreptococos* facultativos presentes en la saliva, 21 a 55% de los *Estreptococos* facultativos de la lengua y 10% de los *Estreptococos* facultativos de la mucosa de los carrillos. Esa bacteria constituye menos de 1 % de los *Estreptococos* facultativos en la placa y en los surcos gingivales. No se considera que la placa dentaria sea una fuente de *S. salivarius* que se recupera de la saliva. Aunque se supone que *S. Sanguis* es el *Estreptococo* dominante de la placa dentaria recién formada en las piezas dentarias, constituye sólo una insignificante porción de la flora de otros sitios de la cavidad bucal. Por tanto, la placa dentaria no es el contribuyente más importante de la flora de la saliva. Para saber si el material de los surcos gingivales puede ser la fuente de las bacterias de la saliva. el estudio de *B. milaninogenicus* muestra que este microorganismo representa 5% o menos, del total de bacterias cultivables obtenidas de surcos gingivales; esto significa menos de 1 % de los aislamientos de la placa, carrillo y lengua, y también menos de 1 %; de las bacterias de la saliva. Esos datos indican que los surcos gingivales no son la

fuerza más importante de las bacterias de la saliva. Por tanto, el origen de las bacterias de la saliva parece ser la lengua.²⁴

2.2.5. Medidas para el control de la placa

Los estudios muestran que la patología periodontal y caries dental puede minimizarse mediante la utilización de programas de control de placa bien supervisados.²⁶ El cepillado por si solo puede no ser suficiente para controlar la placa y debería complementarse con otros métodos mecánicos, (por ejemplo la limpieza interdental), y si es necesario con agentes quimioterapéuticos. En consecuencia, estos agentes, en forma de enjuagues antisépticos están ganando popularidad y se ha publicado un gran número de datos sobre su seguridad y su eficacia. Los profesionales dentales deben recomendar medidas adicionales para la higiene oral sobre la base de las necesidades de sus pacientes. De forma clara, si un paciente mejora su control de la placa y su salud gingival, la utilización de un enjuague dental añadido u otra forma de agente quimioterapéutico puede dejar de ser necesaria.²⁸

Los antisépticos han sido ampliamente utilizados en odontología como agente activo en enjuagues antiplaca, los antisépticos son agentes químicos que matan los microorganismos como las bacterias y los virus o bien interfieren en su reproducción o metabolismo.²⁷

Los antisépticos más comunes en los enjuagues orales son: aceites esenciales (Timol 0.064%, eucaliptol 0.092%, salicilato de metilo 0.060%, mentol 0.042%), triclosan, clorhexidina (CHX), cloruro de cetilpiridinio (CPC) y yodo. También se ha comercializado una mezcla de amina y fluoruro estánnico, por su efecto antiséptico.²⁸

La prevención de la gingivitis, la forma inicial de la enfermedad periodontal, está ampliamente gobernada por la limitación del desarrollo de la biopelícula oral/dental.⁴¹

Como la flora de la placa cambia a medida que madura la biopelícula, un antiséptico oral efectivo debe ser activo contra una amplia variedad de especies incluidos los estreptococos, y otros organismos gram positivos, bacterias fusiformes y otros organismos gram negativos y espiroquetas. Además un antiséptico capaz de penetrar la biopelícula de la placa debería ser más efectivo clínicamente hablando.⁴¹

Los enjuagues de aceite esencial (AE) han demostrado que son eficaces matando numerosos microorganismos implicados en la placa y la gingivitis. De manera específica, los estudios in vitro muestran que *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans* y *S. sanguis* mueren en 30 segundos al igual que las especies *Bacteroides* y *Candida albicans*.²⁹

Tanto en los estudios in vitro como en los in vivo, los enjuagues con AE y Clorhexidina (CHX) han demostrado tener amplios efectos antimicrobianos siendo el enjuague de CHX más efectivo, estos estudios han investigado los efectos sobre los patógenos gram negativos, hongos y virus como los herpes simple de tipo 1 y tipo 2 e influenza A.^{29,30,31,32,33}

Los AE también son capaces de extraer las endotoxinas bacterianas que teóricamente, puede reducir el potencial patógeno de la placa.³⁴

Los enjuagues con AE y especialmente los CHX penetran en la biopelícula de placa y son activos contra las bacterias embebidas en la biopelícula.^{35,36,37.}

Más importante, la eficacia bacteriana de estos productos no está limitada al periodo de enjuague, la significativa eliminación de flora oral es detectable durante varias horas después del enjuague con un producto de AE.^{29,32,38}

De la misma manera, para la CHX la significativa eliminación de la flora oral ha sido detectable durante más de 12 horas después del enjuague.^{37,39,40}

2.2.6. Penetración de la biopelícula dental: impacto del enjuague de aceite esencial

Los enjuagues de aceite esencial (AE) matan los microorganismos mediante la ruptura de sus paredes celulares e inhibiendo su actividad enzimática.^{41,38} Evitan la agregación de las bacterias con las especies pioneras grampositivas, disminuyen la velocidad de reproducción bacteriana y extrae endotoxinas de las patógenas gramnegativas. Ello produce una reducción esperada de la carga bacteriana, una maduración más lenta de la placa y una reducción de la masa de la placa y su potencial patógeno.⁴²

Trabajos recientes han sugerido que los fenotipos bacterianos pueden cambiar cuando los organismos mudan de un estado planctónico (o flotación libre) a un estado sésil (esto es, formando parte de la biopelícula). Este cambio unido al potencial efecto de secuestro de la matriz de la biopelícula, puede dar lugar a una alteración de la susceptibilidad de los agentes antimicrobianos.³⁶

En consecuencia la eficacia de cualquier enjuague antiséptico depende no solo de sus propiedades microbicidas que suelen demostrar *in vitro*, sino también de su capacidad para penetrar en la biopelícula de la placa *in vivo*.⁴³

Varios estudios apoyan el concepto de que los enjuagues con aceites esenciales son capaces de penetrar la biopelícula de placa y que esta acción representa una

significativa proporción de esta capacidad del enjuague para reducir la placa y la gingivitis.⁴³

2.2.7. Diferencias entre enjuagues bucales de clorhexidina y aceites esenciales.

La Clorhexidina tiene una gran afinidad con las superficies de los dientes y las tisulares y ello sirve como un reservorio incluso después del enjuague o la irrigación del agente.⁴⁴

El enjuague con clorhexidina presenta no obstante, ciertas desventajas. Puede provocar la aparición de manchas oscuras en los dientes, en la lengua y en las restauraciones. Dichas manchas requieren la eliminación por un profesional. También puede alterar las percepciones del gusto hasta 4 horas después del enjuague y en algunos casos, su uso ha sido asociado con la aparición de cálculos supragingivales. Estos efectos no deseados que se derivan del uso regular no se han observado de forma habitual en los enjuagues con aceites esenciales, (Timol 0.064%, eucaliptol 0.092%, salicilato de metilo 0.060%, mentol 0.042%) pero si existen algunas quejas sobre su sabor.⁴⁴

En general se recomienda el uso de enjuagues bucales después del cepillado y la limpieza interdental, no obstante con la clorhexidina, y dado que muchos ingredientes de los dentífricos pueden reducir su eficacia antibacteriana, el fabricante recomienda que el paciente sea informado sobre la necesidad de eliminar totalmente cualquier resto de paste de dientes o bien esperar media hora entre el cepillado y el enjuague, los pacientes que usan el enjuague de aceite esencial no necesitan tomar estas precauciones.⁴⁴

En términos microbiológicos, se ha visto que el uso a largo plazo de enjuagues a base de aceites esenciales es seguro. Tras 6 meses de uso diario continuado, los enjuagues de aceites esenciales no provocan ningún cambio en la composición

bacteriana de la placa supragingival (si bien produce una reducción de la flora microbiana total). Específicamente no existen evidencias de un incremento de los patógenos orales putativos y/o oportunistas. Las observaciones realizadas con el enjuague con clorhexidina son similares.⁴⁴

Además la microflora bucal no presenta ningún cambio en la susceptibilidad antiséptica con el tiempo, lo cual sugiere que los enjuagues con aceites esenciales y clorhexidina no fomentan la aparición de resistencia antimicrobiana.⁴⁴

2.2.8. Propiedades y usos adicionales de los aceites esenciales

Actividad antibacteriana.

Además de causar lisis celular en los microorganismos responsables de la placa, la gingivitis y la halitosis de origen bucal, algunos estudios han demostrado que los colutorios a base de aceites esenciales tiene una potente actividad contra las bacterias grampositivas, como *Streptococcus mutans*, que causan caries dental.⁴⁵

Uso doméstico de irrigadores en la gingivitis.

A pesar de las ventajas evidentes de los colutorios a base de aceites esenciales cuando se usan como un complemento del cepillado y el uso del hilo dental diarios, la solución antiséptica puede no alcanzar la profundidad deseada en las bolsas gingivales. Sin embargo, cuando se usan como una solución irrigadora a presión en contacto directo con la bolsa periodontal, los antisépticos pueden alcanzar parcialmente las bacterias subgingivales (con una penetración media del 70% de la profundidad total de la bolsa) y los tejidos inflamados, de otro modo resultan inaccesibles.⁴⁶

Mantenimiento de la salud de los implantes.

Algunos estudios han demostrado también que los colutorios a base de aceites esenciales producen importantes beneficios desde el punto de vista del mantenimiento de la salud gingival alrededor de los implantes.⁴⁵

Uso postquirúrgico.

Los colutorios antisépticos pueden ser útiles tras cirugía periodontal en la primera fase del postoperatorio.⁴⁵

Dos estudios concluyeron que los colutorios a base de aceites esenciales se pueden usar de forma segura en situaciones quirúrgicas y tiene un beneficioso efecto cicatrizante. Asimismo a pesar de tener un pH relativamente bajo no dañan los tejidos duros, o blandos ni interfieren en el proceso de cicatrización.⁴⁷

Eliminación de bacterias en los aerosoles originados durante la atención odontológica.

La transmisión de microorganismos patógenos de la cavidad bucal y la contaminación cruzada durante este tipo de intervenciones y en el consultorio de odontología en general, son motivos de cada vez mayor preocupación debido a la aerosolización de las bacterias orales durante la práctica de intervenciones, como un destarraje con ultrasonido. Esto ha dado pie a la búsqueda de métodos para reducir el riesgo de diseminación bacteriana mediante la realización de enjuagues con colutorios antisépticos antes de proceder con la intervención.⁴⁵

Estudios realizados por Fine y col. Concluyeron que los colutorios a base de aceites esenciales reducen significativamente y de manera espectacular el nivel de bacterias viables en un aerosol producido durante un destarraje por ultrasonidos incluso durante 40 minutos después del enjuague, lo que confirma el valor de los enjuagues efectuados con anterioridad a una intervención como

medida sistemática de la política de control de las infecciones en la consulta de odontología.⁴⁸

Por ello, con la irrigación y/o el enjuague previos a una intervención, los colutorios a base de aceites esenciales pueden reducir el número de bacterias aerosolizadas en el aire del campo operatorio, el recuento de bacterias salivales y el nivel de bacteremia asociado a los procedimientos de destartraje por ultrasonido.⁴⁸ Estas propiedades pueden limitar el potencial de transmisión de infecciones al dentista y al resto del personal de la consulta.⁴⁵

Tratamiento de halitosis.

Los principales componentes del mal aliento de origen bucal son compuestos volátiles sulfurados (CVS) y, en particular, sulfuro de hidrógeno, metilmercaptano y sulfuro de dimetilo. Algunos otros de los elementos que componen el aliento pueden también ser malolientes, como, por ejemplo, ácido butírico o propiónico, diaminas como putrescina y cadaverina, indol y escatol. La mayoría de estos compuestos metaboliza a partir de la degradación proteolítica por parte de bacterias orales de los péptidos y aminoácidos que contienen azufre en su composición y que se encuentran en la saliva, el epitelio descamado, los restos de comida, el fluido crevicular gingival, la placa interdental, el goteo post nasal, y la sabagre.⁴⁹

Las bacterias gramnegativas anaerobias que residen en las superficies de los dientes o de la lengua o en las bolsas periodontales son especialmente generadoras de mal olor, al igual que las especies bacterianas asociadas a la gingivitis.⁵⁰

Sin embargo no todos los casos de halitosis se relacionan con síntomas de gingivitis y/o periodontitis. Así, por ejemplo, hace tiempo que se considera el dorso de la lengua como una fuente primaria del mal olor de boca, puesto que su superficie irregular surcada de profundas fisuras constituye un excelente lugar en

el que quedan atrapadas y crecen las bacterias. Por ello las estrategias de control del mal aliento de origen bucal más eficaces se centran en la reducción de la capa de revestimiento de la lengua y en la prevención y/o paliación de la gingivitis, la periodontitis, y la placa asociada.⁵⁰

Se han demostrado los efectos antimicrobianos in vivo de los colutorios a base de aceites esenciales. En varios estudios se demostraron que el colutorio a base de aceites esenciales redujo de forma considerable la cantidad de bacterias de los espacios sub gingivales generadoras de mal olor en todas las muestras tomadas después del tratamiento y demostró ser muy eficaz para reducir todos los determinantes de halitosis de tipo bucal.⁵¹

Un estudio reciente de Kozlovsky demostró que un colutorio a base de aceites esenciales reducía el nivel de bacterias generadoras del mal olor y las puntuaciones organolépticas durante periodos de 2 horas.⁵²

2.3 Planteamiento del problema

¿Existe actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L a diferentes concentraciones sobre cultivos de flora mixta salival?

2.4 Justificación

Las patologías bucales de mayor prevalencia en nuestra población, como la caries dental y la enfermedad periodontal, están relacionadas con la actividad bacteriana presente en la cavidad bucal.

Las plantas como la *Mentha spicata* L, usados para combatir enfermedades respiratorias, digestivas, entre otras, de origen infeccioso, podría ayudar a prevenir y tratar las enfermedades de importancia odontológica, por sus propiedades antibacterianas, con pocos o ningún efecto colateral indeseable

2.5 Objetivos de investigación

2.5.1 Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana in vitro de aceite esencial de *Mentha spicata* L sobre flora mixta salival

1.5.2.- Objetivos específicos.

- Determinar el rendimiento de las hojas frescas de *Mentha Spicata* L. para la obtención de aceite esencial.
- Determinar la actividad antibacteriana in vitro de aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25% sobre flora mixta salival a las 24 horas.

- Determinar la actividad antibacteriana in vitro de aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% sobre flora mixta salival a las 24 horas
- Determinar la actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 100% sobre flora mixta salival a las 24 horas.
- Comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25%, 50%, 100% y con los controles; positivo y negativo.

2.6 Hipótesis

Existe actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre flora mixta salival

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudio

- Según el tiempo de ocurrencia de los hechos y registros de la información es: **Prospectiva**.
- Según el periodo y secuencia de estudio: **Transversal** (una sola toma de muestra)
- Según el análisis y alcance de los resultados: **Experimental**.

3.2 Población y Muestra

La población la conformaron Trabajadores de la Facultad de Odontología de la UNMSM durante el año 2013

.

La muestra la conformaron 15 Trabajadores de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos elegidos aleatoriamente y que acepten dar el consentimiento informado para participar en el estudio.

3.3 Operacionalización de variables

Variable Independiente:

Concentración del aceite esencial de *Mentha spicata* L. “Menta”

Variable Dependiente:

Inhibición del crecimiento de bacterias debido a la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L.

Variables de control:

Control positivo: Clorhexidina 2 %

Control negativo: Alcohol etílico de 96°

Variable Independiente	Definición	Indicadores	Escala	Categorías
Concentración de aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> L.	Porcentaje del aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> L.	Porcentajes de disolución del aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> L.	Nominal	25%
				50 %
				100%

Variable Dependiente	Definición	Indicadores	Escala	Categorías
Inhibición del crecimiento bacteriano	Inhibición del crecimiento de bacterias debido a la actividad del aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> L.	Tamaño del halo de inhibición formado alrededor del disco embebido con aceite esencial de <i>Mentha spicata</i> L.	Razón	Milímetros

3.4 Materiales

- Embudo de separación
- Frasco de color ámbar
- Jeringas estériles de 5ml.

- Guantes de látex.
- Tubos de ensayo estériles
- Micropipetas
- Hisopos estériles
- Pinzas estériles
- Mechero
- Ron de Quemar
- Discos de papel filtro estériles
- Alcohol de 90°
- Clorhexidina al 2%
- Recipiente para anaerobiosis
- Vela para anaerobiosis
- Campos
- Plumón indeleble

Equipos

- Balanza
- Equipo de hidrodestilación
- Estufa para incubación
- Cámara fotográfica

3.5 Métodos

3.5.1 Procedimientos y Técnicas

Extracción del aceite esencial de *Mentha spicata* L.

Se trabajó con 3500 gramos de hojas frescas de *Mentha spicata* L. Fueron obtenidas en la Provincia de Concepción, Departamento de Junín, Perú. Se trataron en un sistema de hidrodestilación (HD) con arrastre de vapor de agua a

presión y temperatura controlada durante dos horas. El destilado del aceite esencial se recibió en un embudo de separación., con posterior filtración y conservación del aceite en un frasco de vidrio cubierto con papel aluminio para que no se exponga a la luz y en refrigeración.

Rendimiento de las hojas frescas de *Mentha Spicata L.* Para la obtención de aceite esencial.

Se realizó con el volumen de destilado del aceite esencial obtenido en el embudo de separación. Por el método gravimétrico volumétrico se determinó el porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial (%RAE) con la siguiente expresión:

$$\%RAE = \text{Vol. AE (mL)} / \text{Pmuestra (g)} \times 100$$

Donde:

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en ml.

Pmuestra: Peso de la muestra a destilar en gramos.

Obtención de la muestra salival:

La muestra se obtuvo directamente de la cavidad bucal por aspiración, con una jeringa hipodérmica estéril de 5 ml obteniéndose una muestra de 1- 2 ml de saliva no estimulada por persona, tratando de obtenerla en un solo intento, para evitar la contaminación.

Determinación de la actividad antibacteriana in vitro

Método de Difusión en Agar

Fundamento:

La inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición.

Muestra de aceite esencial de *Mentha spicata* L.

El Aceite esencial de *Mentha spicata* L. en concentraciones de 100%, 50% y 25%. Utilizándose como diluyente alcohol etílico de 96°.

Inoculación e incubación de la muestra

Bajo condiciones estériles se procedió a sembrar con un hisopo estéril 100µl de la muestra salival en 15 placas que contengan Agar Tripticasa Soya (TSA).

Con pinzas estériles se colocó en cada placa 5 discos de la siguiente manera: 1 disco de papel filtro con 10 µl de clorhexidina 2% (control positivo), 1 disco de papel de filtro con 10 µl Alcohol etílico de 96° (control negativo), 1 disco de papel de filtro con 10 µl del aceite esencial de *Mentha spicata* L. “*Menta*” al 25%, 1 disco de papel de filtro con 10 µl del aceite esencial de *Mentha spicata* L. “*Menta*” al 50% y 1 disco de papel de filtro con 10 µl del aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 100%.

Las placas se colocaron en una jarra de anaerobiosis y llevadas a incubar a 37 °C por un periodo de 24 horas. Utilizando el método de la vela en extinción.

Control negativo

Se utilizó Alcohol etílico de 96°

Control positivo.

Se usó clorhexidina al 2%

Lectura de los halos de inhibición

Se realizó la lectura con la observación y medición en milímetros (mm) de las zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano, registrándose los diámetros promedios que se formaron alrededor de los discos de papel filtro

3.5.2 Recolección de datos

Se realizó la lectura con la observación y medición en mm. de las zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano, registrándose los diámetros de éstas zonas en una ficha elaborada previamente para este fin, (Anexo 2)

3.5.3. Análisis estadístico

Los datos fueron procesados y analizados en el programa estadístico SPSS v15.

El análisis descriptivo de la variable dependiente (actividad antibacteriana) en los grupos de estudio y control se realizó a través de la media y mediana como medidas de centro y la desviación estándar y rango intercuartílico como medidas de dispersión junto con los valores mínimo y máximo. Para determinar la presencia de distribución normal y homocedasticidad de los datos se aplicó la

prueba de Shapiro-Wilk y de Levene respectivamente. Para comparar las medias entre los grupos se utilizó la prueba ANOVA de un factor, y luego la comparación por pares se realizó con la prueba de Games-Howell no asumiendo varianzas iguales. Se presentó también un gráfico de caja y línea comparando la actividad antibacteriana entre los grupos. Todas las pruebas se trabajaron a un nivel de significancia de 5%.

IV RESULTADOS

Rendimiento de las hojas frescas de *Mentha Spicata* L. para la obtención de aceite esencial.

$$\%RAE = \text{Vol. AE(mL)} / \text{Pmuestra (g)} \times 100$$

$$\%RAE = 4.5\text{ml} / 3500\text{g} \times 100$$

$$\%RAE = 0.128 \text{ v/p}$$

Con la aplicación del método de hidroextracción con arrastre de vapor a temperatura y presión controlada, se obtuvo un rendimiento de 0,128 por ciento v/p.

Tabla 1 Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25% frente a flora salival mixta.

Aceite de <i>Mentha spicata</i> L	N	Actividad antibacteriana (mm)					
		Media	DE*	Mediana	RI [†]	Mínimo	Máximo
al 25%	15	1,4	2,92	0	0	0	8

* DE= desviación estándar

†RI= Rango intercuartílico

De las 15 muestras, el aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25% presenta actividad antibacteriana con una media de 1,4 y desviación estándar de 2,92 (tabla 1).

Tabla 2 Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% frente a flora salival mixta.

<i>Aceite de Mentha spicata</i> L	N	Actividad antibacteriana (mm)					
		Media	DE*	Mediana	RI [†]	Mínimo	Máximo
al 50%	15	6,8	0,56	7	0,5	6	8

* DE= desviación estándar

†RI= Rango intercuartílico

El aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% presenta actividad antibacteriana con una media de 6,8 y desviación estándar de 0,56 (tabla 2).

Tabla 3 Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 100% frente a flora salival mixta.

<i>Aceite de Mentha spicata</i> L	n	Actividad antibacteriana (mm)					
		Media	DE*	Mediana	RI [†]	Mínimo	Máximo
al 100%	15	7,3	0,88	7	1	6	9

* DE= desviación estándar

†RI= Rango intercuartílico

Se aprecia que de las 15 muestras, el aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 100% presenta actividad antibacteriana con una media de 7,3 y desviación estándar de 0,88 (tabla 3).

Tabla 4 Actividad antibacteriana de Control negativo (alcohol 96°) frente a flora salival mixta.

Grupo	N	Actividad antibacteriana (mm)			
		Media	DE*	Mínimo	Máximo
Control negativo	15	0	0	0	0

* DE= desviación estándar

En todos los casos el control negativo no presentó actividad antibacteriana (tabla 4).

Tabla 5 Actividad antibacteriana de Control positivo (clorhexidina 2%) frente a flora salival mixta.

Grupo	N	Actividad antibacteriana (mm)					
		Media	DE*	Mediana	RI [†]	Mínimo	Máximo
Control positivo	15	15,63	0,83	15,5	1,5	14,5	17

* DE= desviación estándar

†RI= Rango intercuartílico

Se aprecia que de las 15 muestras, el control positivo presenta actividad antibacteriana con una media de 15,63 y desviación estándar de 0,83 (tabla 5).

Tabla 6 Prueba ANOVA de un factor

Grupo	N	Media	valor p*
Aceite de <i>Mentha spicata</i> L (25%)	15	1,4	<0,001
Aceite de <i>Mentha spicata</i> L (50%)	15	6,8	
Aceite de <i>Mentha spicata</i> L (100%)	15	7,3	
Control negativo	15	0	
Control positivo	15	15,63	

* Prueba ANOVA de un factor

Cuando se comparó la actividad antibacteriana entre todos los grupos por medio de la prueba ANOVA de un factor se halló diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en al menos uno de los grupos (tabla 6).

Tabla 7 Comparaciones múltiples, Prueba de Games-Howell

		Diferencia	
(I) Grupo	(J) Grupo	de medias (I-J)	Valor p*
Aceite de M. spicata al 25%	Aceite de M. spicata al 100%	-5,9	<0,001
	Aceite de M. spicata al 50%	-5,4	<0,001
	Control negativo	1,4	0,383
	Control positivo	-14,2	<0,001
Aceite de M. spicata al 50%	Aceite de M. spicata al 100%	-0,5	0,368
	Aceite de M. spicata al 25%	5,4	<0,001
	Control negativo	6,8	<0,001
	Control positivo	-8,8	<0,001
Aceite de M. spicata al 100%	Aceite de M. spicata al 50%	0,5	0,369
	Aceite de M. spicata al 25%	5,9	<0,001
	Control negativo	7,3	<0,001
	Control positivo	-8,3	<0,001
Control negativo	Aceite de M. spicata al 100%	-7,3	<0,001
	Aceite de M. spicata al 50%	-6,8	<0,001
	Aceite de M. spicata al 25%	-1,4	0,383
	Control positivo	-15,6	<0,001
Control positivo	Aceite de M. spicata al 100%	8,3	<0,001
	Aceite de M. spicata al 50%	8,8	<0,001
	Aceite de M. spicata al 25%	14,2	<0,001
	Control negativo	15,6	<0,001

* Prueba de Games-Howell

El aceite esencial al 25% no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, ($p=0,383$) pero si existe diferencias estadísticamente significativas con respecto al aceite esencial al 50% ($p<0,001$), al 100% ($p<0,001$) y con el control positivo ($p<0,001$).

Por otro lado el aceite esencial al 50% no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al aceite esencial al 100%, ($p=0,368$) pero si existe diferencias estadísticamente significativas con respecto al aceite esencial al 25% ($p<0,001$), al control negativo ($p<0,001$) y al control positivo ($p<0,001$).

El control positivo presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a todos los demás grupos estudiados ($p<0,001$) (Tabla 7).

Tabla 8 Comparaciones múltiples entre los grupos y subconjuntos existentes

Grupo	N	Actividad antibacteriana (mm)*		
		Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Control negativo	15	0		
Aceite de <i>M. spicata</i> al 25%	15	1,4		
Aceite de <i>M. spicata</i> al 50%	15		6,8	
Aceite de <i>M. spicata</i> al 100%	15		7,3	
Control positivo	15			15,63
Valor p^{\dagger}		0,383	0,369	1

* Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

† Prueba de Games-Howell

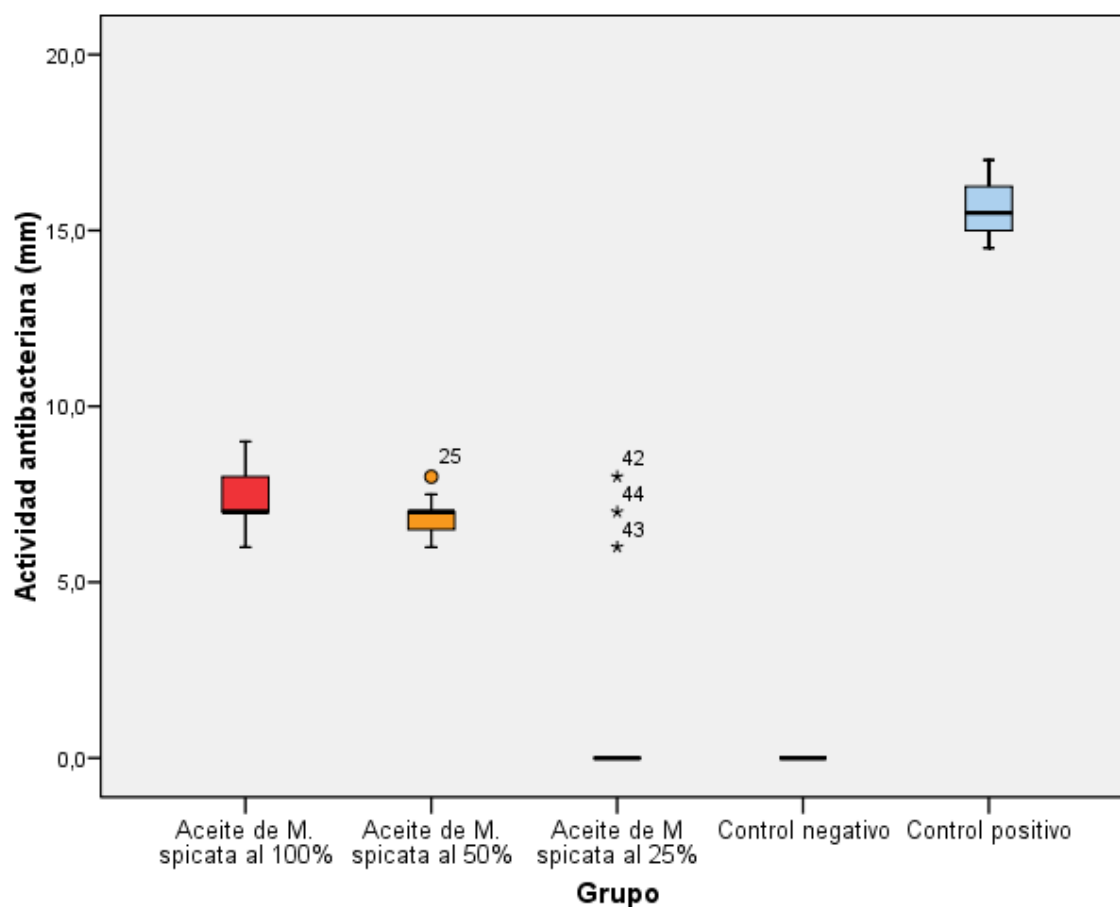
Se forman 3 subconjuntos de acuerdo al comportamiento respecto a la actividad antibacteriana

En el subconjunto 1 se encuentra el control negativo y el aceite esencial al 25% en los cuales no existe diferencias estadísticamente significativas ($p=0.383$), concluyendo que no existe actividad antibacteriana en este subconjunto.

En el subconjunto 2 se encuentra el aceite esencial al 50% y el aceite esencial al 100% quienes no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,369$) pero la actividad antibacteriana es mayor que el subconjunto 1

En el subconjunto 3 se encuentra el control positivo, éste presenta una mayor actividad antibacteriana que los subconjuntos 1 y 2.

Gráfico 1 Actividad antibacteriana de los 5 grupos de estudio



Se observa la mayor actividad antibacteriana en el control positivo en la parte superior derecha del gráfico. Una menor actividad antibacteriana con el aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 100% y 50%. El control negativo y el aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25% no presentan actividad antibacteriana. (Gráfico 1).

V DISCUSIÓN

Se obtuvo aceite esencial de las hojas frescas de *Mentha spicata* L. proveniente de la Provincia de Concepción, Departamento de Junín, Perú. Por el método de hidrodestilación, se obtuvo un rendimiento del 0,128 % v/p, que estaría sujeto a factores como variedad de la especie, medio ecológico y zonas geográficas. Lo que se sustenta en trabajos realizados en aceites esenciales obtenidos en otras especies; tales como *Origanum vulgare* L. (orégano), (0,22 %).⁵⁴, *Minthostachys mollis* (muña) (0,19%).⁵³, *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” (1,25 %).⁵⁵, *Zingiber officinalis* “Jengibre” (0,8%).⁵⁶, *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron, var. *Truxillense* (Rugby) Plowman “coca”; con un rendimiento del 0,06 % v/p.⁵⁷ Percy D. Aronés Castro. (MIMDES) Reporta que las hojas *Mentha piperita* L. Según el análisis realizado en la Comunidad de Tranca (Ayacucho) reporta 2.5 % de aceite esencial. Por encima de estándares europeos que contiene de 0.5 % a 1 % de aceite esencial.¹⁷

El aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25% no presenta actividad antibacteriana, comportándose de la misma forma que el control negativo.

Por otro lado el aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 100%, ($p=0,368$), pero su actividad antibacteriana es significativamente mayor al control negativo.

El control positivo presenta mayor actividad antibacteriana con diferencias estadísticamente significativas con respecto a todos los demás grupos estudiados ($p<0,001$).

Estudios de los efectos antimicrobianos de aceites esenciales de *Mentha spicata* y *Eucalyptus camaldulensis* y clorhexidina frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, in vitro e in vivo relacionado a la formación de

biopelículas. Concluyeron que los aceites esenciales de *E. camaldulensis* y *M. spicata* retrasan significativamente la formación de biofilm y pueden contribuir al desarrollo de tratamientos anticaries nuevos.¹

Las propiedades antimicrobianas y la prevención de formación de biofilm de aceites esenciales *Mentha piperita* y *Rosmarinus officinalis* y clorhexidina evaluados frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*. Encontraron una mayor eficacia de aceite esencial de *M. piperita*. Las propiedades inhibitorias de biopelículas estaban en el orden de *M. piperita* > *R. officinalis* > clorhexidina. En experimentos in vivo sobre las propiedades antibiopelícula reveló que todas las concentraciones de los aceites fueron significativamente representativas ($p < 0,001$) más eficaz que la clorhexidina. Concluyeron que, los aceites esenciales pueden ser considerados como agentes seguros en el desarrollo de agentes antibiopelícula novedosas.²

Sabahat S. y Col. investigaron las actividades antibacterianas de las diferentes formas de menta (*Mentha piperita*) es decir, acuosas, infusión, decocción, jugo y aceite esencial frente a 100 aislamientos pertenecientes a 11 diferentes especies de bacilos, *Escherichia coli* (30), *Klebsiella pneumoniae* (25), *Pseudomonas aeruginosa* (15), *Salmonella typhi* (5), *S. paratyphi* A (1), *S. paratyphi* B (1), *Proteus mirabilis* (10), *P. vulgaris* (2), *Shigella dysenteriae* (5), *Yersinia enterocolitica* (1), y *Enterobacter aerogenes* (5). La detección se realizó por el método estándar de difusión en disco. El aceite esencial de menta muestra mayor actividad antimicrobiana con 11,78 mm media zona de inhibición.

Habiba B. y Col. (2011) Realizaron análisis y la identificación de los aceites esenciales hidrodestilados de dos especies de menta (*Mentha spicata* y *Mentha pulagium*). Se tamizó su actividad antagonista frente a algunas bacterias patógenas. La selección de los dos aceites esenciales para su actividad antagonista contra bacterias patógenas revela que no tienen una actividad

apreciable excepto la observada frente *Streptococcus pyogenes* (20 y 16 mm para *M. spicata* y *M. Pulagium* respectivamente).¹⁰

Kalp G.y Col. (2002) Se investigaron los aceites esenciales de menta piperita *Mentha piperita* L. (Lamiaceae), que se utilizan en sabores, fragancias, y productos farmacéuticos, fueron investigados por sus propiedades antimicrobianas contra 21 microorganismos patógenos para humanos y vegetales. La bioactividad del mentol y aceites mentona se comparó utilizando la combinación de técnicas in vitro, tales como microdilución, difusión en agar, y bioautografía. Se demostró que todos los aceites de menta tamizadas, presentan fuerte inhibición para microorganismos patógenos para las plantas, mientras que para los patógenos humanos fueron sólo moderadamente inhibido. La composición química de los aceites fueron analizados por GC y GC / MS. Usando el ensayo de bioautografía, mentol se encontró que era responsable de la actividad antimicrobiana de estos aceites.¹²

Dany C. Estudió la Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* (manzanilla). Concluyendo que existe un efecto inhibitorio positivo a las concentraciones de 25%, 50% y 100% del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” en cultivos de flora mixta salival. Las concentraciones al 25% y 50% del aceite de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” no mostraron diferencias significativas entre ellas. Las concentraciones al 100% del aceite de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” tiene una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las concentraciones de 25% y 50% sobre flora mixta salival. El grupo control de clorhexidina 0.12% mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto a las concentraciones al 25% y 50%, sobre flora mixta salival.⁵⁸

VI CONCLUSIONES

1. El aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Mentha spicata* L. Por el método de hidrodestilación, tiene un rendimiento del 0,128 % v/p, que estaría sujeto a factores de variabilidad como; variedad de la especie, medio ecológico y zonas geográficas.
2. El aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25% no presenta actividad antibacteriana
3. El aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% y al 100 % presentan igual actividad antibacteriana
4. La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% y al 100 % es significativamente mayor al control negativo.
5. La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% y al 100 % es significativamente menor a la clorhexidina al 2%.

VII RECOMENDACIONES

1. Se recomienda trabajar con una muestra mayor para que los resultados sean de una mayor significancia estadística.
2. Estudios de composición del aceite esencial de *Mentha spicata* L. por los métodos de Espectrometría de Masas y Cromatografía de Gases.
3. Estudios de la capacidad penetración del aceite esencial de *Mentha spicata* L. en la placa dental
4. Estudios sobre el uso del aceite esencial de *Mentha spicata* L. Como componente antiséptico de los enjuagues bucales e irrigadores.
5. Estudios de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre los aerosoles originados durante la atención odontológica.
6. Estudios del aceite esencial de *Mentha spicata* L. como nueva alternativa para el tratamiento halitosis de origen bucal.

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la actividad antibacteriana in vitro de aceite esencial de *Mentha spicata* L. a concentraciones del 25%, 50% y 100% sobre flora mixta salival. El tipo de estudio fue prospectivo, transversal, experimental. La población la conformaron trabajadores de la Facultad de Odontología de la UNMSM durante el año 2013. La muestra la conformaron 15 trabajadores elegidos aleatoriamente. Como control positivo se usó: Clorhexidina 2 % y como control negativo: alcohol etílico de 96°. Para la extracción del aceite esencial se usó 3500 gramos de hojas frescas de *Mentha spicata* L. Se trataron en un sistema de hidrodestilación (HD) con arrastre de vapor de agua a presión y temperatura controlada durante 2 horas. La muestra salival se obtuvo directamente de la cavidad bucal por aspiración, con una jeringa hipodérmica estéril de 5 ml obteniéndose una muestra de 1- 2 ml de saliva no estimulada por persona. Se determinó la actividad antibacteriana in vitro por el método de Difusión en Agar. Para el análisis estadístico: Los datos fueron procesados y analizados en el programa estadístico SPSS v15. El análisis descriptivo de la variable dependiente en los grupos de estudio y control; se realizó a través de la media y mediana como medidas de centro y la desviación estándar y rango intercuartílico como medidas de dispersión junto con los valores mínimo y máximo. Para determinar la presencia de distribución normal y homocedasticidad de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y de Levene respectivamente. Para comparar las medias entre los grupos se utilizó la prueba ANOVA de un factor, y luego la comparación por pares se realizó con la prueba de Games-Howell no asumiendo varianzas iguales. Se concluye que el aceite esencial tiene un rendimiento del 0,128 % v/p. El aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 25% no presenta actividad antibacteriana. El aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% y al 100 % presentan igual actividad antibacteriana. La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 50% y al 100 % es significativamente mayor al control negativo, pero significativamente menor con relación al de la clorhexidina al 2%.

Abstract

In the present study, it is determined the in vitro antibacterial activity of special oil *Mentha spicata L.* at concentrations of 5%, 50% and 100% on mixed salivary flora. The type of the study was prospective, transversal and experimental. The population was composed by Odontology school workers at UNMSM during 2013. The sample consist of 15 randomly selected workers. It was used, as positive control: *Chlorhexidine* 2% and as a negative control: *Ethyl Alcohol* of 96%. For extracting the essential oil, it was used 3500 grams of fresh leaves of *Mentha spicata L.* They were treated in a hydrodistillation system with drag pressure steam and controlled temperature for 2 hours. The salivary sample was directly obtained of the oral cavity by suction, with a five milliliters sterile hypodermic syringe. A sample of 1-2 milliliters of unstimulated saliva per person was obtained. Antibacterial in vitro activity was determine by Agar diffusion method. For statistical analysis: The data were processed and analyzed in the statistic program SPSS v15. Descriptive analysis of the dependent variables in the study and control groups was performed using the average and median as center measures and the standard deviation and interquartile range as dispersal measures along with minimum and maximum values. For determining the presence of normal distribution and homoscedasticity of the data, *Shapiro-Wilk* test and *Levene* test were applied respectively. For comparing the measurements between groups, ANOVA test of a factor was used, and then the comparison of pairs was done with the *Games-Howell* test, not assuming equal variances. In conclusion, the essential oil of *Mentha spicata L.* at 25 % does not present antibacterial activity. The essential oil of *Mentha spicata L.* at 50% and at 100% has the same antibacterial activity. The antibacterial activity of essential oil of *Mentha spicata L.* at 50% and at 100% is significantly higher than the negative control, but significantly lower in relation to the *Chlorhexidine* at 2%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rasooli I, Shayegh S, Astaneh S. The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. Source Department de Biología de la Universidad de Shahed, Teherán, Irán. 2009.
2. Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Astaneh SD. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. Department of Biology, Shahed University, Opposite Imam Khomeini's Shrine, Tehran-Qom Highway, Tehran, Iran.
3. Deepak Dwivedi, Gaurav Khandelwal, Antimicrobial Activity Of *Mentha Arvensis* Against Clinical Isolates Of Human Cariogenic Pathogens- An *In-Vitro* Study, Bhopal- 462 003, Madhya Pradesh, Haridwar- 249 404, Uttarakhand, , India 2012. IJPSR (2012), vol. 3, No. 05 Disponible en línea en www.ijpsr.com 1355.
4. Hajlaoui Hafedh, Ben Abdallah Fethi, Snoussi Mejdí. Efecto de la menta *longifolia* L. ssp *longifolia* aceite esencial sobre la morfología de cuatro bacterias patógenas visualizado por microscopía de fuerza atómica. Borj-Cedria, BP273 -Soliman8020,Túnez, 2010.
5. Djenane D, Yangüela J, Idir L, D Gómez. Efectos antioxidantes y antibacterianas de los aceites esenciales de *Lavandula* y *Mentha* en carne picada de vacuno inoculada con *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración. BP 17, 15000, Tizi-Ouzou, Argelia. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789458>
6. Sabahat Saeed, Naim Asma, Tariq Perween. Actividad Antibacteriana In Vitro De La Menta. Pak. J. Bot, 38 (3):. 869-872, 2006. Pakistán.
7. Juan Rojas y col. Evaluación *in vitro* de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. An Fac med. 2010;71(3):161-5

8. Sabahat SAEED, Tariq PERWEEN. Actividades Antibacterianas de *Mentha Piperita*, *Pisum sativum* y *Momordica charantia*. Karachi 75270, Pakistán. 2005.
9. E. Padmini, A. Valarmathi, M. Usha Rani: El análisis comparativo de la composición química y actividades antibacterianas de *Mentha spicata* y *Camellia sinensis*. *ASIAN J. EXP. BIOL. SCI.* VOL 1(4) 2010:- 772- 781
10. Habiba Boukhebt, Adel Nadjib Chaker, Hani Belhadj, Farida Sahli. Composición química y actividad antibacteriana de *Mentha L. pulegium* y *Mentha spicata L.* aceites esenciales. *Der Pharmacia Lettre*, 2011: 3 (4) 267-275. Disponible en www.scholarsresearchlibrary.com
11. Cynthia Walter, Zabta K. Shinwari, Imran Afzal y Riffat N. Malik: Actividad Antibacterial De Plantas Medicinales Usado En Pakistán. *Pak. J. Bot.*, 43: 155-162, Special Issue, December, 2011.
12. GO KALP İÜSÜCAN, NESÜE KIÜRİÜMER, MIÜNE KU RKCU OGÜ LU, K. HU SNU CAN BASÜER, FATIÜH DEMIÜRCLÜ. Screening antimicrobiana de *Mentha piperita* Aceites Esenciales. *Plantas Medicinales y Aromáticas and Drug Research Centre (TBAM)*, Anadolu University, 26470-Eskisüehir, Turquía. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3943-3946-3943
13. Abhishek Mathur, Reena Purohit, Deepika Mathur, GBKS Prasad, V. K. Dua. Investigación farmacológica del extracto de metanol de *Mentha piperita L.* raíces sobre la base de propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anti-inflamatorias. *Der Pharmacia Sinica*, India. 2011, 2 (1): 208-216 Disponible en www.pelagiaresearchlibrary.com
14. Abhishek Mathur, G.B.K.S. Prasad, Nageshwar Rao, Pradeep Babu, V.K. Dua. Aislamiento e Identificación de los Antimicrobianos Compuesto de *Mentha piperita L.* *Rasayan J. Chem*: Vol.4, No. 1 (2011), 36-42
15. Francisco.Javier Gans Llorens. Fitoterapia. *Rev. Xurdimento*. Febrero-2008-2-de-7. Pag 28-29
16. Victoria Hall Ramirez y col. *Plantas Medicinales Volumen II*. Centro Nacional de Medicamentos Costa Rica, Mayo 2002

17. Percy D. Aronés Castro. Manual para la Producción de Plantas Aromáticas y Medicinales. Ministerio de la Mujer y Desarrollo Social – MIMDES. Mayo 2007
18. PDR for Herbal medicines. 2000 2ª Edición Editorial Medicor Economics Comp USA.
19. The Lawrence Review of Natural Products. 1992. Facts and Comparisons (ISSN 0734-4951) Missouri, USA.
20. Colegio Oficial de Farmacéuticos de Bizkaina. Asociación española de Médicos Naturistas. Fitoterapia, Vademécum de Prescripción: Plantas medicinales. 1998. Barcelona, España.
21. La Valle, J. Natural Therapeutics Pocket Guide. 2000-2001. 1ª Edición. Lexi-Comp, Inc. Ohio, USA.
22. Heck, A, DeWitt, B, Likes, A. Potential Interacción between alternative therapeutics and warfarin. Am J Health-Syst Pharm. 2000: 57. Pag 1221-1227.
23. Negroni M. Microbiología estomatológica. Ed. Médica Panamericana: Buenos Aires 1999: 200-207
24. Moromi H. Manual de prácticas de microbiología general y estomatológica. Lima, Perú 2002: 92-101
25. Bandoni, A. 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. UNLP-CYTED. Bs. As.
26. Axelsson, P. & Lindhe, J. (1987) Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man. J Clin Periodont. 14, 205-212.
27. Ciancio, S.G. (2000) Antiseptics and antibiotics as chemotherapeutic agents for periodontitis management. Compend Contin Educ Dent. 21, 59-78.
28. Ciancio S.: Mejora de la salud bucodental: consideraciones actuales. J Clin Periodontol 2003 (Supl. 5): 4-6.


29. Ross, N.M., Charles, C. H., Dills S.S. (1989) Long-term effects of Listerine antiseptic on dental plaque and gingivitis. *Journal of Clinical dentistry* 1, 92-95.
30. Kubert, D., Rubin, M., Barnett, M.L., Vincent, J.W. (1993) Antiseptic mouthrinse-induced microbial cell surface alterations. *American Journal of Dentistry* 6, 277-279.
31. Pitts. G., Brogdon, C., Hu, L., Masurat, T., Pianotti, R.,Schumann, P. (1983) Mechanism of action of an antiseptic. Anti-odor mouthwash. *Journal of Dental Research* 62, 738-742.
32. DePaola, L.G., Minah, G.E., Overholser, C.D., Meiller, T.f., Charles, C.H., Herper, D.S., McAlary. M. (1996) Effect of an antiseptic mouthrinse on salivary microbiota. *American Journal of Dentistry* 9, 93-95.
33. Jenkins, S., Addy, M., Wade, W., Newcombe, R.G. (1994) The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *Journal of Clinical Periodontology* 21, 397-401.
34. Dennison, D.K., Meredith, G.M., Shillitoe, E.J.,Caffesse, R.G., (1995) The antiviral spectrum of Listerine antiseptic. *Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Endodontics* 79, 442-448.
35. Fine, D.H., Furgang, D., Lieb, R., Korik, I., Vincent, J.W., Barnett, M.L., (1996) Effects of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. *Journal of Clinical Periodontology* 23, 444-451.
36. Pan, P., Barnett, M.I., Coelho, J., Brogdon, C., Finnegan, M.B: (2000) Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *Journal of Clinail Periodontology* 27, 256-261.
37. Netuschil, L., Weiger, R.,Preisler, R., Brex, M. (1995) Plaque bacteria countsan vitality during chlorhexidine, meridol and Listerine mouthrinses . *Europena Journal of Oral Science* 103, 355-361.
38. Fine, D.H., Furgang, D., Barnett, M.L., (2001) Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm

- forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Periodontology* 28, 697-700.
39. Addy, M. & Wright, R. (1978) Comparison of The in vivo and in vitro antibacterial properties of providone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses, *Journal of Clinical Periodontology* 5, 198-205.
 40. Schiott, C.R. (1973) Effect of chlorhexidine on the microflora of the oral cavity. *Journal of Periodontal Research Suppl.* 12, 7-10.
 41. Bernimoulin J-P: Conceptos recientes sobre formación de placa, *J Clin Periodontol* 2003 (Suppl. 5): 7-9.
 42. Fine, D.H. (1988) Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American journal of Dentistry 1, 259-263.
 43. Ouhayoun J-P: Penetración de la biopelícula de la placa: impacto del enjuague de aceite esencial. *J Clin Periodontol* 2003 (Suppl. 5): 10-12.
 44. Santos A: Control evidencial de la placa y la gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003 (Suppl. 5): 13-16.
 45. Seymour R: Propiedades y usos adicionales de los aceites esenciales. *J Clin Periodontol* 2003 (Suppl. 5): 19-21.
 46. Bowsma, O. J. (1996) The status, future, and problems of oral antiseptics. *Current Opinion in Periodontology* 3: 78-84.
 47. Zambom, J. J., Ciancio, S. G., Mather, M. L., Charles, C. H. (1989) The effect of an antimicrobial mouthrinse on early healing of gingival flap surgery wounds. *Journal of Periodontology* 60: 31-34.
 48. Fine, D. H., Yip, J., Furgang, D., Barnett, M. L., Olshan, A. M., Vincent, J. (1993) Reducing bacteria in dental aerosols: Pre-procedural use of an antiseptic mouthrinse. *Journal of the American Dental Association* 124: 56-58.
 49. Quirynen, M., Avontroodt, P., Soers, C., Zhao, H., Pauwels, M., Coucke, W., van Ateenberghe, D. (2002b) The efficacy of amine fluoride/stannous fluoride in the suppression of morning breath odour. *Journal of Clinical Periodontology* 29: 944-954.

50. Tonzetich, J., et al. (1977) Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. *Journal of Periodontology* 48, 13-20.
51. Pitts, G., Brogdon, C., Hu, L., Masurat, T., Pianotti, R., Shumann, P. (1983) Mechanism of action of an antiseptic, anti-odor mouthwash. *Journal of dental Research* 62, 738-742.
52. Kozlovsky, A., Goldberg, S., Natour, I., Rogatky-Gat, A., Gelernter, I., Rosenberg, M. (1996) Efficacy of a 2-phase oil: Water mouthrinse in controlling oral malodor, gingivitis, and plaque. *Journal of Periodontology* 67, 577-582.
53. Cano C. 2007. Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis para optar al Grado de Magister. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima.
54. Anchante R. 1998. Estudio de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.
55. Carhuapoma YM. 2006. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán". UNMSM, Lima.
56. Vásquez O; Alva A; Marreros J. 2001. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zengiber officinali*) RAIA,V1, N°1, P.38-42.
57. Castro A. 2008. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.
58. Dany A. 2010 Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* manzanilla. TESIS para optar el título de Cirujano Dentista. UNMSM. Lima.

ANEXOS

Anexo 1

	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA MUSEO DE HISTORIA NATURAL	
---	--	---

"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

CONSTANCIA N°. 260-USM-2012

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Hierba), recibida de **Bélden Iván MAMANI CURAZI**; ha sido estudiada y clasificada como: ***Mentha spicata* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE



GENERO: *Mentha*

ESPECIE: *Mentha spicata* L.

Nombre vulgar: "Menta".
Determinado por: Dra. Haydeé Montoya (Eduardo Navarro).

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 03 de octubre de 2012



Dra. HAYDEÉ MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú	Telfs. (511) 471-0117, 470-4471 470-7918, 619-7000 anexo 5703	e-mail: museohn@unmsm.edu.pe http://museohn.unmsm.edu.pe
--	--	---

Anexo 2

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACION DEL ESTUDIO Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

Título: “Actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mentha spicata* L. sobre flora mixta salival”.

Investigador: Belden Ivan Mamani Curazi

Institución: Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos

La información que se describe a continuación, describe la presente investigación y el papel que usted desempeña como participante de la misma.

Objetivo de la Investigación

Determinar la actividad antibacteriana in vitro de aceite esencial de *Mentha spicata* L sobre flora mixta salival

Participación en el Estudio

Recolección de 1 a 2 ml. de muestra salival.

Procedimientos que se seguirán durante la investigación

Usted será uno de los 15 Trabajadores de la Facultad de Odontología de la U.N.M.S.M. cuya muestra salival será recolectada en jeringas estériles a razón de alrededor de 2 ml y se procesarán dentro de un máximo de 60 minutos subsiguientes en tubos de ensayo estériles hasta obtener la concentración a la escala Nº 0,5 de Mac Farland. Después de ello, dichas muestras se sembrarán mediante hisopo estéril en placas de Agar Tripticasa Soya (TSA). Luego mediante el método de difusión, en discos de papel filtro, estos serán embebidos con 10 microlitros de las siguientes soluciones

- 1.- *Mentha spicata* L.al 100%
- 2.- *Mentha spicata* L.al 50%
- 3.- *Mentha spicata* L.al 25%
- 4.- Alcohol de 96° (control negativo)
- 5.- Clorexidina 2% (control positivo)

Los discos serán colocados con pinzas estériles en las placas y se procederá a incubarlas por 24 horas en aerobiosis por 37°C para su posterior lectura y medición de sus halos de inhibición.

Confidencialidad:

La ficha de datos en la cual se identifica a usted y el consentimiento informado que firmó serán revisados por el investigador. Los resultados de esta investigación podrán presentarse para su exposición, sin embargo, su identidad no será divulgada en tales presentaciones.

Consentimiento:

He leído y conversado con el investigador sobre esta hoja de información y formato de consentimiento y entiendo el contenido. Por tanto doy consentimiento voluntario para participar en la investigación.

Nombres y Apellidos

Firma

Fecha: ____/____/____

Anexo 3

Ficha de recolección de Datos

Medición de los halos de inhibición, en milímetros, de 15 placas con medios de cultivo TSA. Cada uno con 5 discos de papel filtro embebidos en con aceite esencial de *Mentha spicata* L. al 100%, 50%, 25%, como control negativo alcohol de 96° y como control positivo clorhexidina al 2%. La medición se realizará en milímetros (mm).

Placa	Soluciones				
	1	2	3	4	5
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

1.- *Mentha spicata* L. al 100%

2.- *Mentha spicata* L. al 50%

3.- *Mentha spicata* L. al 25%

4.- Alcohol de 96° (control negativo)

5.-Clorhexidina 2% (control positivo)

Anexo 4

Registro fotográfico.

Mentha spicata L





Separando las hojas de los tallos



Sistema de Hidrodestilación



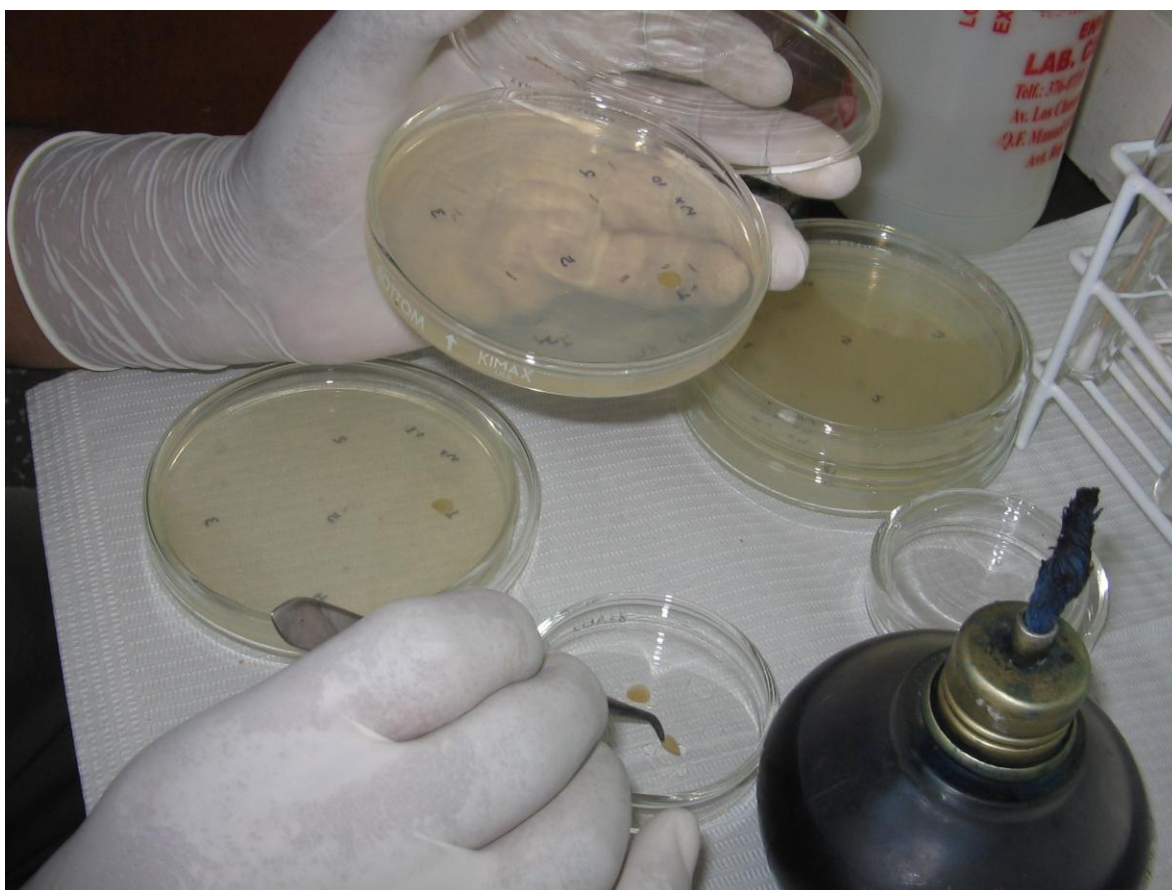
Colección del aceite esencial



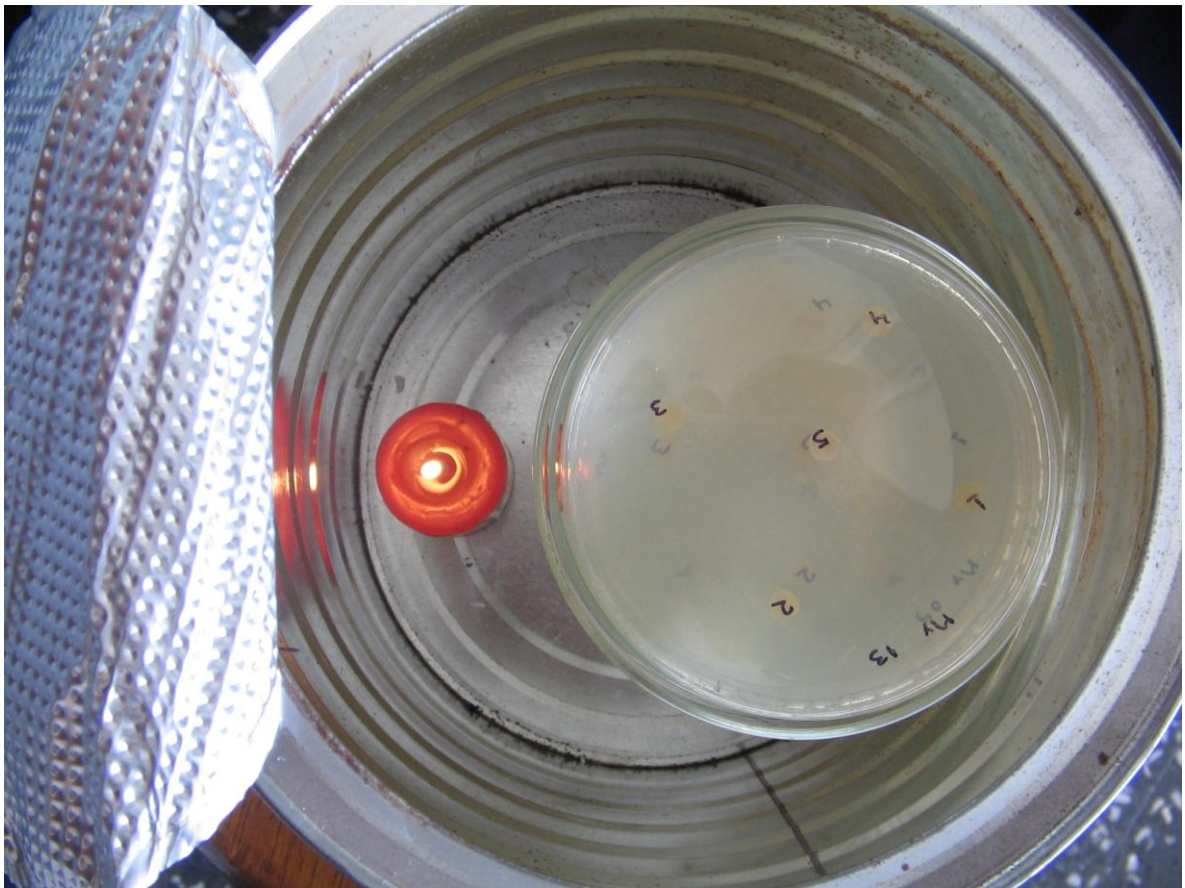
Mesa de trabajo

Materiales, instrumentos, muestras.

Colocación de los discos de papel filtro embebidos con las muestras correspondientes



Colocación de las placas preparadas en un recipiente para anaerobiosis



Recipiente de anaerobiosis en la estufa para control del calor



Halos de inhibición formados después de 24 horas

